

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

**ANALISIS Y SIMULACION DE NUEVOS NANOMATERIALES
PARA LA LIBERACION DE FARMACOS**



Memoria y Anexos

Autor: Joel Acero Narvaez
Director: Joan Torras Costa
Convocatoria: Mayo 2018

1. Resum

En el present treball s'ha realitzat la simulació per Dinàmica Molecular de dos ferritinas modificades per mitjà del programa AMBER. Tenint com a objectiu comprovar l'estabilitat de l'estructura d'aquestes ferritinas, el 4His- ΔC * i el MIC1, usant diferents metalls divalents (coure, níquel i zinc). Primer s'ha realitzat un calibratge dels sistemes seguint una simulació clàssica, on s'ha minimitzat, escalfat i equilibrat per NVT i NTP (volum, pressió i temperatura constant). Posteriorment s'ha fet la producció del sistema fins 90ns. Finalment s'han extret i analitzat les dades dels centres metàl·lics i els ponts d'hidrogen dels dímers per comprovar l'estabilitat de les caixes proteiques, ja que aquestes es poden usar com a estructures portadores de medicaments.

En els resultats es va poder apreciar que les geometries dels centres metàl·lics mostraven un comportament força estable, els centres amb coure presenten una estructura tetraèdrica, amb níquel tenen una estructura plana quadrada i amb el zinc mostra una estructura de tetraedre distorsionat (balanci). Aquestes estructures estan definides per la coordinació de l'ió metàl·lic amb les molècules d'aigua, el níquel i zinc es coordinen amb una molècula d'aigua, el coure no presentava cap coordinació. Dels centres amb calci l'únic que es coordina és el centre que té menys enllaços amb els aminoàcids.

També es va observar que les mutacions de Tirosina i Asparagina dels sistemes MIC1 amb coure i zinc fan menys ponts d'hidrogen respecte als sistemes 4His- ΔC * però mantenint l'estabilitat de la caixa proteica, per la seva banda el sistema amb níquel (Ni- MIC1) presenta més ponts d'hidrogen respecte al Ni-4His- ΔC *. Això, que va en contra de les dades experimentals, és per una aproximació introduïda en aquesta simulació de MD clàssica que força una estabilitat superficial.

2. Resumen

En el presente trabajo se ha realizado la simulación por Dinámica Molecular de dos ferritinas modificadas por medio del programa *AMBER*. Teniendo como objetivo comprobar la estabilidad de la estructura de dichas ferritinas, el 4His- ΔC^* y el MIC1, usando diferentes metales divalentes (cobre, níquel y zinc). Primero se ha realizado un calibrado de los sistemas siguiendo una simulación clásica, en donde se ha minimizado, calentado y equilibrado por NVT y NTP (volumen, presión y temperatura constante). Posteriormente se ha hecho la producción del sistema hasta 90ns. Por último se han extraído y analizado los datos de los centros metálicos y los puentes de hidrogeno de los dímeros para comprobar la estabilidad de las cajas proteicas, ya que estas se pueden usar como estructuras portadoras de medicamentos.

En los resultados se pudo apreciar que las geometrías de los centros metálicos mostraban un comportamiento bastante estable, los centros con cobre presentan una estructura tetraédrica, con níquel tienen una estructura plana cuadrada y con el zinc muestra una estructura de tetraedro distorsionado (balancín). Estas estructuras están definidas por la coordinación del ion metálico con las moléculas de agua, el níquel y zinc se coordinan con una molécula de agua, el cobre no presentaba ninguna coordinación. De los centros con calcio el único que se coordina es el centro que tiene menos enlaces con los aminoácidos.

También se observó que las mutaciones de Tirosina y Asparagina de los sistemas MIC1 con cobre y zinc hacen menos puentes de hidrogeno respecto a los sistemas 4His- ΔC^* pero manteniendo la estabilidad de la caja proteica, por su parte el sistema con níquel (Ni-MIC1) presenta más puentes de hidrogeno respecto al Ni-4His- ΔC^* . Esto, que va en contra de los datos experimentales, es por una aproximación introducida en esta simulación de MD clásica que fuerza una estabilidad superficial.

3. Abstract

In the present work, the simulation by Molecular Dynamics of two modified ferritins has been carried out through the AMBER program. The objective is to verify the stability of the metallic centers of these ferritins, the 4His- ΔC^* and the MIC1, using different divalent metals (copper, nickel and zinc). First, the systems have been calibrated following a classical simulation, minimized, heated and balanced by NVT and NTP (volume, pressure and constant temperature). Subsequently the production of the system has been made up to 90ns. Finally, the data of the metallic centers and the hydrogen bonds of the dimers have been extracted and analyzed to check the stability of the protein boxes, they can be used as drug carrying structures.

In the results the geometries show a fairly stable behavior, the metallic centers with copper have a tetrahedral structure, with nickel they have a square flat structure and with the zinc shows a structure of seesaw. These structures are defined by the coordination of the metal ion with the water molecules, the nickel and zinc are coordinated with a water molecule, the copper does not present coordination. Of the centers with calcium, the only one that coordinates is the center that has fewer links with the amino acids.

We observed the mutations of Tyrosine and Asparagine from the MIC1 systems with copper and zinc make less hydrogen bonds with respect to the 4His- ΔC^* systems but maintaining the stability of the protein box, meanwhile the system with nickel (Ni-MIC1) has more hydrogen bonds with respect to Ni-4His- ΔC^* , which goes against the experimental data, is by an approach introduced in this simulation of classical MD that forces a surface stability.



4. Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, a mis padres Grimaldo Acero y Antonia Narváez, y a mis hermanos, Julio y Cinthya, quienes han estado conmigo y me han apoyado siempre pese a las adversidades de la vida, es un orgullo y una satisfacción para mí dedicarles este trabajo. Son las personas que más quiero en la vida, sin ellos nada hubiera sido lo mismo.

También agradezco a las personas que he conocido y me han ayudado a lo largo de todo este tiempo, una especial mención a mis amigos Lenin, Alexis, Kevin y Anton que he conocido y con quienes he compartido muy buenos momentos.

Por último, agradezco al tutor de este TFG Joan Torras por haberme ayudado y guiado a lo largo de estos días que ha durado el proyecto, un recuerdo para Guillem Ruano que fue la persona que me ayudó con los problemas que surgían cuando realizaba este trabajo.

Índice

1. RESUM	I
2. RESUMEN	II
3. ABSTRACT	III
4. AGRADECIMIENTOS	V
1. PREFACIO	XVI
1.1. Origen del trabajo	xvi
1.2. Motivación	xvi
1.3. Requerimientos previos.....	xvi
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. Objetivos del trabajo.....	19
2.2. Alcance del trabajo	19
3. LA FERRITINA	21
3.1. ¿Que es la Ferritina?	21
3.2. Estructura de la Ferritina	21
3.3. Interacción entre monómeros.....	22
3.4. Sistemas modificados	24
3.4.1. Introducción	24
3.4.2. Aplicaciones en la Bionanotecnología.....	24
3.4.3. Residuos Implicados	25
3.4.4. Rediseño para obtener la modificación 4His-ΔC*	27
3.4.5. Modificación MIC1	31
4. DINÁMICA MOLECULAR	34
4.1. Concepto General	34
4.1.1. Condiciones generales de simulación	34
4.2. Principios de la Dinámica Molecular	34
4.2.1. Integración de la Segunda ley de newton.....	34
4.2.2. Campos de fuerza	35
4.2.3. Condiciones de contorno	37
4.3. Programas informáticos de MD.....	38
4.4. AMBER.....	38
4.4.1. Programas preparatorios	40

4.4.2.	Programas de simulación.....	40
4.4.3.	Programas de análisis	40
5.	METODOLOGÍA	41
5.1.	Simulación.....	41
5.1.1.	Sistema de Partida	41
5.1.2.	Minimización.....	42
5.1.3.	Calentamiento.....	43
5.1.4.	Equilibrado NPT.....	45
5.1.5.	Equilibrado NVT	45
5.1.6.	Producción NVT.....	46
5.2.	Extracción de Datos	47
5.2.1.	Desviación media cuadrática	47
5.2.2.	Distancias de enlace.....	48
5.2.3.	Ángulos de enlace	49
5.2.4.	Ángulos Diedros	49
5.2.5.	Función de distribución radial	49
5.2.6.	Puente de hidrogeno	51
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1.	Datos de Geometría.....	52
6.1.1.	Sistema 4His- ΔC^*	52
6.1.2.	Sistema MIC1	61
6.2.	Función de Distribución Radial	69
6.2.1.	Sistema 4His- ΔC^*	69
6.2.2.	Sistema MIC1	76
6.3.	Puentes de hidrogeno	84
6.3.1.	Sistema 4His- ΔC^*	84
6.3.2.	Sistema MIC1	85
5.	ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL	95
6.	CONCLUSIONES	96
7.	ANÁLISIS ECONÓMICO	98
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	100
9.	ANEXO A.....	102
A1.	Centros Metálicos.....	102

A2. Comandos Cpptraj	106
----------------------------	-----

Lista de Imágenes

Imagen 1. Forma de la ferritina.....	21
Imagen 2. (a) Estructura del monómero tipo L, tiene 4 cadenas grandes (A-D) y una pequeña al final de la cadena (E). (b) Estructura del monómero tipo H, tiene 4 cadenas grandes (A-D) y una pequeña (BC) entre dos cadenas largas. (c) Posición de los monómeros al formar la caja proteica, se puede ver los poros que se forman (C2, C3 y C4). Fuente: [6].....	22
Imagen 3. (a) Unión de dos monómeros paralelos–C2. (b) Intersección de tres monómeros diferentes –C3. (c) Centros donde se intersectan cuatro monómeros diferentes –C4.	23
Imagen 4. (A) Vista de los poros de la ferritina (C4, C3, C2 y CM), se pueden ver los ligandos implicados. (B) Vista del interior del núcleo de la ferritina. Fuente: [9]	23
Imagen 5. Campos en los que se podría usar la ferritina, en medicina y dispositivos electrónicos. Fuente: [9]	25
Imagen 6. Residuo Histidina.....	25
Imagen 7. Residuo Aspartato	26
Imagen 8. Residuo Glutamato.....	26
Imagen 9. Residuo Glutamina	26
Imagen 10. Diferencias entre MeTIR y rMeTIR, arriba y abajo respectivamente. Los puntos rojos son los iones metálicos. Fuente: [17].....	27
Imagen 11. (a) Interfaz C2 de la ferritina nativa vista desde el interior de la caja. (b) El dímero C2 del Cu-4His- ΔC^* . Fuente [17]	28
Imagen 12. Centro Metálico C4. Un metal unido a 4 histidinas.....	28
Imagen 13. (a) Centro Metálico C3, dos calcio enlazados a 3 aspárticos y 3 glutámicos.	29
Imagen 14. (a) Centro C2-A, 4 histidinas unidas a un metal. (b) Centro C2-B, una glutamina y un aspártico unidos a un ion calcio.	30
Imagen 15. Centros CM, dos metales unidos a una histidina y 3 glutámicos.	30
Imagen 16. Diferentes ensamblajes de varias ferritinas modificadas. Fuente: [17]	31
Imagen 17. (a) Velocidad de sedimentación del MIC1 en diferentes estados. (b) Interfaz C2 del MIC1 con las mutaciones Y39E y N74E. Fuente: [17]	32
Imagen 18. Centro C3, 3 glutámicos y 3 aspárticos unidos a un metal.	32
Imagen 19. Centro CM, dos glutámicos y un histidina unidas a un metal.	33
Imagen 20. Función de la energía potencial para las interacciones moleculares en la aproximación de mecánica molecular. Fuente: [19]	36
Imagen 21. Una representación simple del Force Field (FF), que es la base de los estudios de mecánica cuántica (QM). El FF simplifica la cantidad de partículas requeridas para las simulaciones de MD. Fuente: [20]	37
Imagen 22. Representación del método de condiciones periódicas de contorno.	37
Imagen 23. Diagrama de flujo del funcionamiento de AMBER. Fuente: [22]	39
Imagen 24. Caja ortogonal de simulación. Se puede ver el sistema de la ferritina rodeada de moléculas de agua.	41
Imagen 25. Esquema de todos los pasos que se han hecho, desde la minimización hasta la producción.	42

Imagen 26. Ilustración de la solvatación de un ion, el círculo punteado es la primera esfera de solvatación, el ion es el círculo central, los círculos blancos son aguas de coordinación y el círculo negro es el que no tiene coordinación, molécula de solvatación. Fuente: [28].....	51
Imagen 27. Residuos que hacen puentes de hidrogeno en el dímero. Fuente: [29]	51
Imagen 28. (a) Estructura del C4 de 4 histidinas enlazadas al cobre. (b) Representación tetraédrica, los diedros D1 y D2 están formados por los planos rayados y sólidos, respectivamente. (c) Esquema simplificado, se pueden ver los ángulos A1-A4 y las distancias -E - entre histidina y metal.	52
Imagen 29. (a) Vista frontal del C3, se puede la forma de pirámide trigonal que forma un calcio (color gris) con los aspartatos y el otro calcio, que esta atrás, con los glutamatos. (b)Vista de lado del C3, se puede ver todos los enlaces del GLU y ASP con los dos calcios.....	54
Imagen 30. (a), (b) Representación de la vista frontal y trasera del C3, se puede apreciar los enlaces y ángulos formados entre residuos y calcios. (c) Vista de costado del C3, se puede ver mejor los enlaces calcio-ligando.....	54
Imagen 31. (a) Estructura de C2-A, un metal enlazado a 4 histidinas. (b) Visualización de los diedros que formados en el C2-A. (c) Ángulos formados entre metal-ligando.	56
Imagen 32. (a) Estructura C2-B, un aspártico y una glutamina enlazados a un calcio. (b) Angulo diedro del C2-B. (c) Ángulos y distancias formados entre calcio-ligando.	57
Imagen 33. Distancias entre los metales divalentes del centro C2-A (dist_Me_Me) y entre calcios del centro C2-B (dist_Ca_Ca).....	58
Imagen 34. (a)Centro metálico CM formado por dos metales, tres glutamatos y una histidina. (b)Representación del ángulo diedro del centro metálico. (c) Distancias y ángulos formados en el centro CM.	59
Imagen 35. (a) ángulos diedros del centro C4. (b) Representación simplificada del C4, se indican los ángulos que se forman entre metal-histidina.	61
Imagen 36. (a)Centro metálico C3 se forma un octaedro. (b)Los diedros formados entre el calcio y los residuos. (c) y (d) ángulos y distancias formados entre los residuos y el calcio.....	62
Imagen 37. (a) Estructura del C4. Se indican los ángulos diedros. (b) Se indican los ángulos formados por el metal y los nitrógenos.	64
Imagen 38. (a) Ángulos diedros del centro C2-B. (b) ángulos y distancias del centro C2-B.	65
Imagen 39. La flecha roja es la distancia entre metales del C2-A y la flecha azul es la distancia entre calcios del C2-B.	66
Imagen 40. (a)Centro metálico CM. (b) Representación del CM. ángulos diedros formados por el ion metálico y los ligandos. (c) ángulos y distancias entre el metal y los residuos.....	67
Imagen 41. Agua coordinada con el centro C4 del sistema Zn-4His-ΔC*.....	70
Imagen 42. Tres aguas de solvatación en el centro C3 del sistema Zn-4His-ΔC*.....	72
Imagen 43. Aguas de solvatación en el centro metálico C2-A (4His) del sistema Zn-4His-ΔC*.....	73
Imagen 44. Aguas de coordinación del centro C2-B (Ca) del sistema Cu-4His-ΔC*.	74
Imagen 45. Agua coordinada al centro CM del sistema Zn-4His-ΔC*.....	76
Imagen 46. Aguas de solvatación del centro C3 del sistema Cu-MIC1.	79
Imagen 47. Aguas coordinadas al centro C2-A (4His) del sistema Zn-MIC1.	81
Imagen 48. Aguas de solvatación del centro CM del sistema Zn-MIC1.	83

Imagen 49. Aminoácidos que hacen puente de hidrogeno en el dímero del sistema CU-4His-ΔC*	84
--	-----------

Lista de Tablas

Tabla 1. Distancias y ángulos del centro C4 de los sistemas 4His- ΔC^* .	53
Tabla 2. Ángulos diedros del centro C4 de los sistemas 4His- ΔC^* .	53
Tabla 3. Distancias E1-E6 del centro C3 de los sistemas 4His- ΔC^* .	55
Tabla 4. Distancias E7-E12 del centro C3 de los sistemas 4His- ΔC^* .	55
Tabla 5. Ángulos del centro C3 de los sistemas 4His- ΔC^* .	55
Tabla 6. Ángulos diedros del centro C3 de los sistemas 4His- ΔC^* .	56
Tabla 7. Distancias entre los dos iones del centro C3 de los sistemas 4His- ΔC^* .	56
Tabla 8. Distancias y ángulos del centro C2-A (4His) de los sistemas 4His- ΔC^* .	57
Tabla 9. Ángulos diedros del centro C2-A (4His) de los sistemas 4His- ΔC^* .	57
Tabla 10. Distancias, ángulos y ángulos diedros del centro C2-B (Ca) de los sistemas 4His- ΔC^* .	58
Tabla 11. Distancias entre metales de los centros C2-A (4His) y C2-B (Ca) de los sistemas 4His- ΔC^* .	58
Tabla 12. Distancias E1-E4 del centro CM de los sistemas 4His- ΔC^* .	59
Tabla 13. Distancias E5-E8 del centro CM de los sistemas 4His- ΔC^* .	59
Tabla 14. Ángulos del centro CM de los sistemas 4His- ΔC^* .	60
Tabla 15. Ángulos diedros del centro CM de los sistemas 4His- ΔC^* .	60
Tabla 16. Distancias entre los dos metales del centro CM de los sistemas 4His- ΔC^* .	60
Tabla 17. Distancias y ángulos del centro C4 de los sistemas MIC1.	61
Tabla 18. Ángulos diedros del centro C4 de los sistemas MIC1.	62
Tabla 19. Distancias del centro C3 de los sistemas MIC1.	62
Tabla 20. Ángulos del centro C3 de los sistemas MIC1.	63
Tabla 21. Ángulos diedros del centro C3 de los sistemas MIC1.	63
Tabla 22. Ángulos y distancias del centro C2-A (4His) de los sistemas MIC1.	64
Tabla 23. Ángulos diedros del centro C2-A (4His) de los sistemas MIC1.	64
Tabla 24. Distancias, ángulos y diedros del centro C2-B (Ca) de los sistemas MIC1.	65
Tabla 25. Distancias entre metales de los centros C2 de los sistemas MIC1.	66
Tabla 26. Distancias del centro CM del sistema MIC1.	67
Tabla 27. Ángulos y diedros del centro CM del sistema MIC1.	68
Tabla 28. Resultado de la RDF de los centros C4 del 4His- ΔC^* .	70
Tabla 29. Resultado de la RDF de los centros C3 del 4His- ΔC^* .	71
Tabla 30. Resultados de la RDF de los centros C2A (4His) del 4His- ΔC^* .	73
Tabla 31. Resultados de la RDF de los centros C2-B (Ca) del 4His- ΔC^* .	74
Tabla 32. Resultados de la RDF de los centros CM del 4His- ΔC^* .	76
Tabla 33. Resultados de la RDF de los centros C4 del MIC1.	77
Tabla 34. Resultado de la RDF de los centros C3 del MIC1.	78
Tabla 35. Resultados de la RDF de los centros C2A (4His) del MIC1.	80
Tabla 36. Resultados de la RDF de los centros C2B (Ca) del MIC1.	82
Tabla 37. Resultados de la RDF de los centros CM del MIC1.	83

Tabla 38. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero de los sistemas Cu-4His- ΔC^* y Ni-4His- ΔC^* . Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por ciento, d_{OH} es la distancia (\AA) y α es el ángulo (en grados).....	86
Tabla 39. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero del sistema Zn-4His- ΔC^* . Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por cierto, d_{OH} es la distancia (\AA) y α es el ángulo (en grados).....	88
Tabla 40. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero de los sistemas Cu-MIC1 y Ni-MIC1. Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por ciento, d_{OH} es la distancia (\AA) y α es el ángulo (en grados).....	90
Tabla 41. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero del sistema Zn-MIC1. Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por ciento, d_{OH} es la distancia (\AA) y α es el ángulo (en grados).	92
Tabla 42. Coste de trabajo.	98

Lista de Gráficas

Gráfica 1. RMSD de todo el sistema, el movimiento de las moléculas es estabiliza en los 10ns.	48
Gráfica 2. RMSD de las histidinas, se puede ver que a partir de los 10ns apenas varían en 0,5 Å.....	48
Gráfica 3. Ejemplo del histograma de probabilidad de la distribución radial, la función de distribución radial (línea solida) y su integración (línea punteada). Fuente: [27]	50
Gráfica 4. Distribución Radial de los centros C4 del sistema Cu-4His- ΔC^*	69
Gráfica 5. Distribución Radial de los centros C3 del sistema Cu-4His- ΔC^*	71
Gráfica 6. Distribución Radial de los centros C2A (4His) del sistema Zn-4His- ΔC^*	72
Gráfica 7. Distribución Radial de los centros C2-B (Ca) del sistema Cu-4His- ΔC^*	74
Gráfica 8. Distribución Radial del centro CM del sistema Cu-4His- ΔC^*	75
Gráfica 9. Distribución Radial del centro C4 del sistema Cu-MIC1.	77
Gráfica 10. Distribución Radial del centro C3 del sistema Cu-MIC1.	78
Gráfica 11. Distribución Radial del centro C3 del sistema Zn-MIC1.....	79
Gráfica 12. Distribución Radial del centro C2-A (4His) del sistema Ni-MIC1.	80
Gráfica 13. Distribución Radial del centro C2-B (Ca) del sistema Cu-MIC1.....	81
Gráfica 14. Distribución Radial del centro CM del sistema Cu-MIC1.....	82

1. Prefacio

1.1. Origen del trabajo

En los últimos tiempos la nanotecnología ha cobrado importancia debido a sus posibles aplicaciones en diferentes campos, uno de ellos es la nanomedicina. Al poder diseñar nuevos materiales o estructuras que alberguen fármacos muy tóxicos en su interior para posteriormente liberarlos, resulta muy interesante para el tratamiento de cáncer o la reducción de tumores. Uno de estos materiales podría ser la ferritina.

1.2. Motivación

La realización de este trabajo surgió por un interés personal al tratarse sobre las aplicaciones que podría tener la ferritina en el campo de la bionanotecnología como potencial estructura portadora de fármacos y su posterior liberación en el sitio más adecuado para el tratamiento de enfermedades tan complicadas de curar, como el cáncer.

Es por esto que tuve una preferencia al elegir ésta sobre otros temas, también por el interés de aprender sobre el campo de la simulación y el diseño de las proteínas por medio de programas informáticos.

1.3. Requerimientos previos

Para este trabajo era necesario asimilar los conceptos básicos sobre la dinámica molecular para entender las estimaciones de movimiento que hace el programa *AMBER*[1] al realizar la simulación del sistema. Cabe mencionar que es necesario leerse el manual de dicho programa para entender y saber aplicar los diferentes tipos de comandos que se están ejecutando en cada paso, como por ejemplo en el calibrado del sistema. El programa *AMBER* se utilizará tanto para la parte de la simulación como para la extracción de datos.

Otro programa que es necesario conocer es el VMD (Visual Molecular Dynamics) [2] con el que se puede ver y animar las trayectorias (evolución dinámica y espacial de las partículas del sistema) de los sistemas a simular. Este programa es importante porque, al poder visualizar los sistemas, sirve de ayuda en la ubicación de los centros metálicos y los puentes de hidrogeno para su análisis.

Por ultimo era necesario un conocimiento mínimo de los comandos básicos del sistema operativo Linux para poder acceder a los datos y realizar los cálculos en un “cluster” de computadoras.

Todos los trabajos de simulación, que se envían a calcular, se coordinan a través de un programa de gestión de colas que reparte los recursos de computación disponibles en función de la lista de cálculos en espera (SLURM).

2. Introducción

2.1. Objetivos del trabajo

El objetivo principal de este trabajo es comprobar la estabilidad de la súper-estructura en forma de jaula de las metaloproteínas 4His- ΔC^* y su mutación MIC1, y el papel que juegan los diferentes centros metálicos en la estabilidad de éstas, utilizando herramientas de simulación de dinámica molecular. Para llegar al objetivo principal se ha establecido unos más sencillos los cuales son:

- Entender los conceptos básicos de la dinámica molecular y su empleo para evaluar el comportamiento de las moléculas.
- Comprender como trabaja el programa *Amber*.
- Analizar la estabilidad de la estructura de nanojaula tipo Ferritina que presentan las proteínas 4His- ΔC^* y MIC1 en presencia de diferentes centros metálicos divalentes de cobre, níquel y zinc.
- Comprobar cómo afectan las fuerzas intermoleculares, puentes de hidrogeno y atracción electrostática, en los diferentes sistemas con centros metálicos.
- Evaluar el impacto que tienen los metales en la estabilidad de las proteínas tipo ferritinas modificadas.
- Como repercuten en la estabilidad del sistema las mutaciones del sistema MIC1 con respecto al 4His- ΔC^* .

2.2. Alcance del trabajo

Para comprobar la estabilidad de la estructura de la nanojaula de las proteínas 4His- ΔC^* y MIC1 en función del metal divalente que contienen, se partirá de 6 sistemas proteicos diferentes en función del metal divalente que contienen: Cu-4His- ΔC^* , Ni-4His- ΔC^* , Zn-4His- ΔC^* , Cu-MIC1, Ni-MIC1, Zn-MIC1 y se les someterá a diversos procesos de simulación para obtener su estructura más estable. Primero se hará una minimización del sistema, luego se introducirá la velocidad a las partículas de cada sistema mediante un calentamiento, seguidamente se realizara una equilibrado a presión constante hasta una densidad constante, luego se procederá a un relajamiento del sistema y finalmente se dejara evolucionar el sistema durante un tiempo hasta 90ns. De la última evolución temporal del sistema se extraerán datos estructurales y de interacción química para poder estudiar de manera comparativa la estabilidad de cada uno de los sistemas simulados.

3. La Ferritina

3.1. ¿Que es la Ferritina?

Es una proteína intracelular universal que almacena Hierro y lo libera de manera controlada. La proteína es producida por casi todos los organismos vivos, incluidas algas, las bacterias, las plantas superiores y los animales [3]. En los humanos, actúa como un amortiguador contra la deficiencia y sobre carga de hierro. Se encuentra mayormente en el hígado, mucosa intestinal y medula ósea. La ferritina que no está asociada al hierro se llama *apoferritina*.

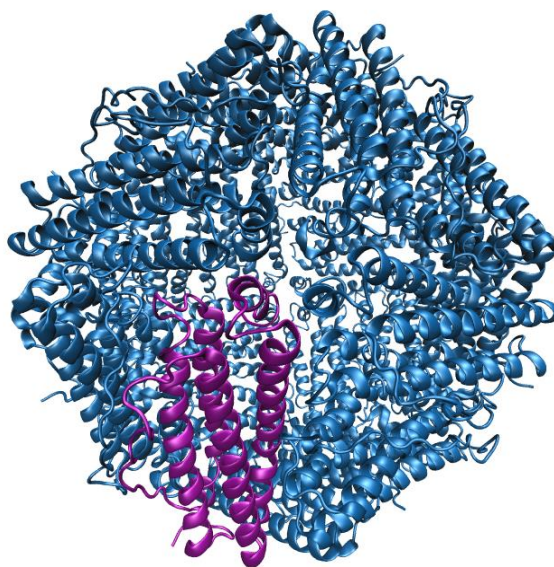


Imagen 1. Forma de la ferritina

3.2. Estructura de la Ferritina

La ferritina tiene una forma esférica hueca –o jaula– (Imagen 1) la cual está constituida por 24 subunidades (monómeros) proteicas ensambladas entre sí. Esta estructura tiene 120Å de diámetro exterior y una cavidad interna de 70-80 Å aproximadamente con un peso molecular de 480-430 kDa. También tiene un núcleo de oxihidroxilico férrico, comúnmente llamado “*ferrihidrita*”, el cual juntamente con la jaula tiene un peso de 900 kDa[4]. Esta estructura es estable hasta 85°C y tolera parcialmente niveles altos de urea, cloruro de guanidio y otros desnaturalizantes a pH neutro[5].

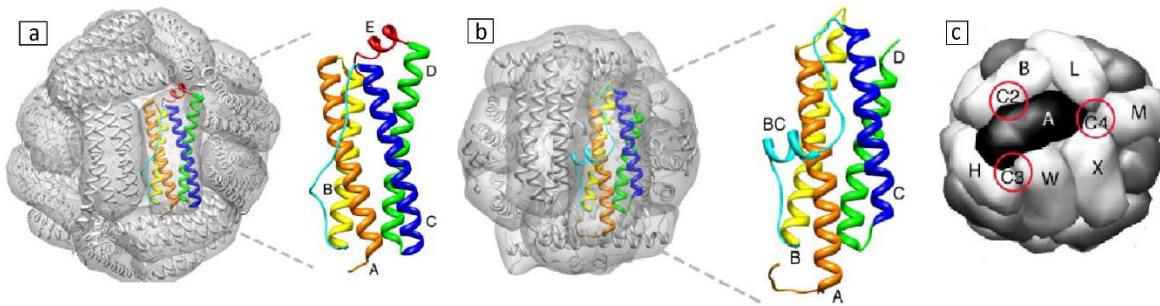


Imagen 2. (a) Estructura del monómero tipo L, tiene 4 cadenas grandes (A-D) y una pequeña al final de la cadena (E). (b) Estructura del monómero tipo H, tiene 4 cadenas grandes (A-D) y una pequeña (BC) entre dos cadenas largas. (c) Posición de los monómeros al formar la caja proteica, se puede ver los poros que se forman (C2, C3 y C4). Fuente: [6].

Normalmente, la estructura proteica (Imagen 2) de la ferritina está formada por dos tipos de cadenas, la H – ferritina (Heavy) está formada por 183 residuos en secuencia con una masa molecular de 21kD (mayormente en el corazón). La cadena L – Ferritina (Light) está formada por 175 residuos y una masa molecular de 19kD (mayormente en el hígado)[7].

Cada monómero está formado por cinco cadenas (cuatro grandes y una pequeña) en forma de hélice α , estas cadenas están unidas por unas láminas plegadas (lamina β). Estas cadenas están constituidas por un carbono central ($C\alpha$) que está enlazado a un grupo carboxilo ($C=O$) y a un grupo amino ($N-H$), esta secuencia es la que forma la cadena polipeptídica.

3.3. Interacción entre monómeros

La ferritina, debido a que presenta una disposición compacta, presenta unos poros a lo largo de sus ejes de simetría, estos ejes son llamados C3 y C4 (Imagen 3-a, b). Estos tipos de poros son cítricos para la función de la ferritina de liberar hierro de forma controlada. También hay otro tipo de poro en donde dos hélices de dos monómeros diferentes se encuentran en paralelo, esta unión se llama C2 (Imagen 3 c).

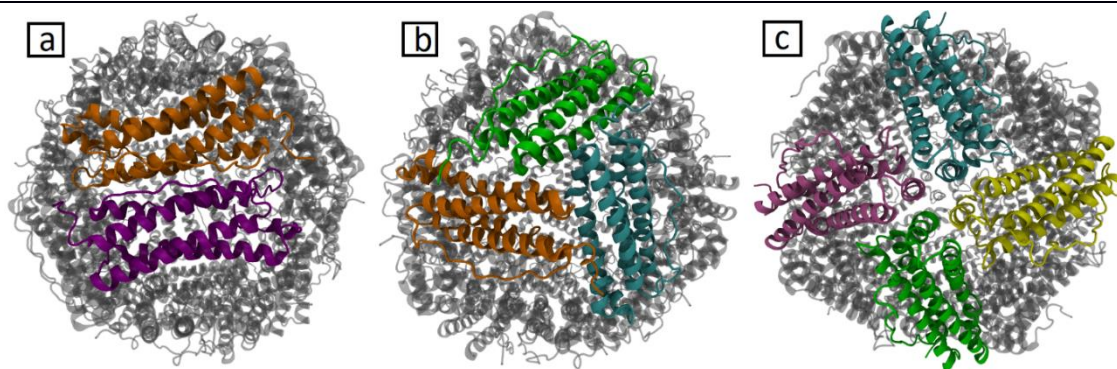


Imagen 3. (a) Unión de dos monómeros paralelos–C2. (b) Intersección de tres monómeros diferentes –C3. (c) Centros donde se intersectan cuatro monómeros diferentes –C4.

Estos poros presentan unas interfaces, refiriéndose a la unión de monómeros, entre cadenas helicoidales (L y H) que están altamente estabilizadas por enlaces de puente de hidrogeno que se establecen entre los residuos de las cadenas.

El poro C3 es donde entra el hierro a la molécula, aunque lo metales pueden ocupar diferentes posiciones dado que los ligandos de estos poros tienen cierta flexibilidad, y el poro C4 en la superficie puede participar en la nucleación de la ferridrita. Según un estudio se puede cambiar este factor mediante mediciones de resonancia electrónica o con electrodos selectivos de iones de varios metales (Mn^{2+} , Cd^{2+} y Vo^{2+})[8].

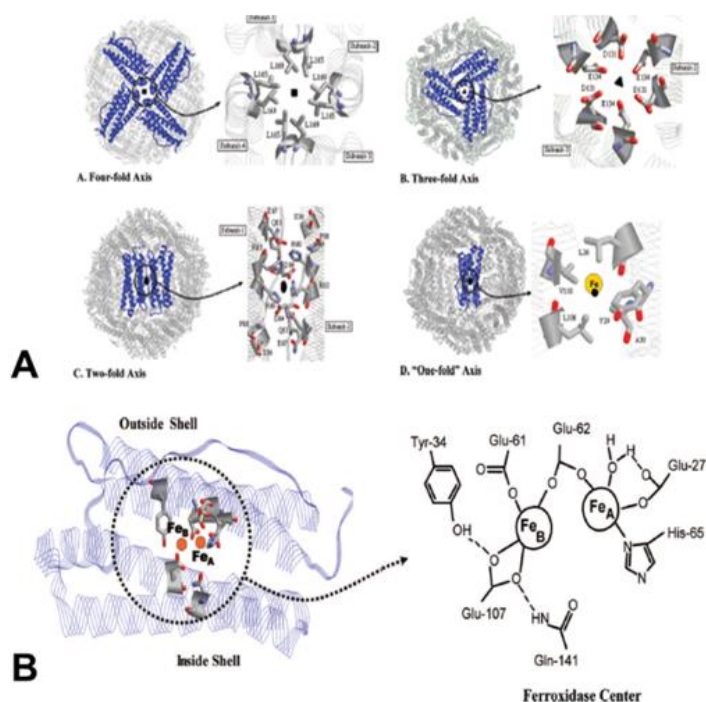


Imagen 4. (A) Vista de los poros de la ferritina (C4, C3, C2 y CM), se pueden ver los ligandos implicados. (B) Vista del interior del núcleo de la ferritina. Fuente: [9]

3.4. Sistemas modificados

3.4.1. Introducción

Las interacciones proteína – proteína (protein–protein interactions - PPI) desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento de redes celulares dinámicas y en el ensamblaje de estructuras biológicas. Tener la capacidad de ejercer un poder externo sobre las PPI nos llevara a una mejor comprensión y explotación de los sistemas de proteínas auto-ensambladas [10]. Este control es importante en las posibles aplicaciones de liberación controlada de fármacos ya que nos permitirá gestionar el ensamblado y el desmontaje de dichas estructuras para poder cargar y liberar fármacos respectivamente, según a conveniencia.

Para hacer que los PPI sean receptivos a los estímulos externos se necesita rediseñar apropiadamente una interfaz estable de tal manera que las interacciones no covalentes puedan activarse o desactivarse en masa respondiendo a una única señal [11]. Es decir, es necesario la introducción de un interruptor químico.

La integración directa de un interruptor químico en una interfaz proteína – proteína es una tarea muy compleja de llevar a cabo, y para ello es necesario la utilización de un inductor químico [12], que oriente y facilite el proceso, para formar suficientes interacciones con ambas proteínas para (1) proporcionar una fuerza motriz capaz de reemplazar muchas interacciones nativas no covalentes y (2) mantener la alineación geométrica de la interfaz nativa facilitando el ensamblado. Los iones metálicos pueden cumplir con estos dos requisitos comportándose como inductores químicos de PPI. La coordinación del metal con las cadenas laterales de los aminoácidos de ambos lados de la interfase puede proporcionar energías de unión significativamente más altas que las interacciones no covalentes y simultáneamente imponer restricciones geométricas estrictas.

Se ha demostrado que la coordinación de los iones de metales de transición divalentes podría conducir a la oligomerización de una proteína monomérica en conjuntos supramoleculares [13]; este enfoque fue explotado recientemente para facilitar la cristalización de proteínas con PPI inducida por metales.

3.4.2. Aplicaciones en la Bionanotecnología

Cada vez es más frecuente hacer uso de estructuras basadas en proteínas para producir nuevas estructuras y materiales, especialmente con componentes inorgánicos. La combinación de materiales inorgánicos con proteínas como la ferritina es interesante ya que en su interior puede albergar diferentes tipos de materiales y/o fármacos. Para esto es necesario hacer nanomateriales que permitan el ensamblaje de esas estructuras complejas.

La ferritina es usada, normalmente, por su estructura biológica, estabilidad y capacidad de mineralizar una variedad de metales dentro de su estructura [14], al igual de poder rediseñar su interior por ingeniería genética [15]. Por lo que si se combina la especificidad del material en la superficie y la mineralización en su interior, se podrían usarse para ensamblar una variedad de nuevos materiales.

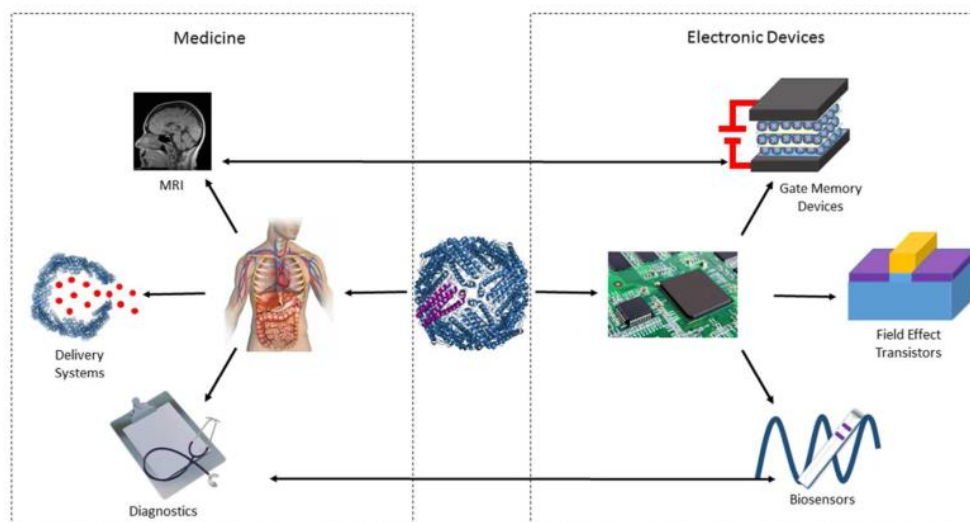


Imagen 5. Campos en los que se podría usar la ferritina, en medicina y dispositivos electrónicos.

Fuente: [9]

3.4.3. Residuos Implicados

Antes de explicar las ferritinas modificadas es necesario explicar los residuos implicados en las diferentes interfaces de la ferritina (C4, C3, C2, CM), estos residuos son válidos para la variación 4His- ΔC^* y MIC1.

Residuo Histidina

Abreviado como HID, tiene un anillo, *imidazol*, cumple la función de base Lewis para formar un enlace de coordinación con un metal divalente. A la histidina se le ha extraído un hidrogeno del nitrógeno exterior y el OH del grupo carboxilo.

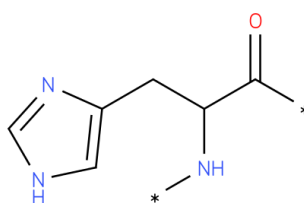


Imagen 6. Residuo Histidina.

Residuo Aspartato

Abreviado como ASP, un grupo carboxilo hace de base Lewis enlazándose a un metal por coordinación. Al ácido aspártico se le ha extraído el grupo hidroxilo (-OH) de uno de sus carboxilos. Y al nitrógeno se le ha extraído un hidrogeno.

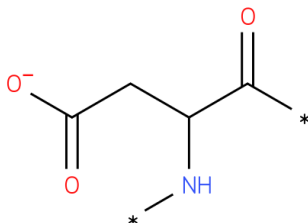


Imagen 7. Residuo Aspartato

Residuo Glutamato

Abreviado como GLU, el ion carboxilato hace de base Lewis enlazándose a un metal por coordinación. Al ácido glutámico se le ha extraído el grupo hidroxilo (-OH) de uno de sus carboxilos. Y al nitrógeno se le ha extraído un hidrogeno.

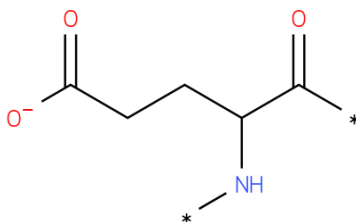


Imagen 8. Residuo Glutamato

Fuente:

Residuo Glutamina

Abreviado como GLN, el oxígeno se enlaza al metal por coordinación. A la glutamina se le ha extraído el grupo hidroxilo (-OH) de su carboxilo. Y al nitrógeno se le ha extraído un hidrogeno.

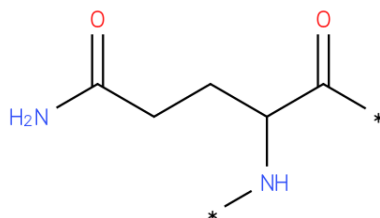


Imagen 9. Residuo Glutamina

3.4.4. Rediseño para obtener la modificación 4His- ΔC^*

Este tipo de ferritina se ha obtenido por el autoensamblado de la ferritina humana (H - maxiferrina) aplicado el método rMeTIR.

El rMeTIR (reverse Metal-Templated Interface Redesign) es una reinterpretación del MeTIR (Metal-Templated Interface Redesign) [16]. En el MeTIR, se parte de una proteína monomérica la cual se autoensambla a través de un paso de oligomerización con un metal y posteriormente se reordena y se estabiliza las interfaces en el oligomero resultante.

En el rMeTIR, el primer paso consiste en la formación de uniones de coordinación para metales específicos que encajen de una manera no restringida, serán los tres tipos de interfaces simétricas de la ferritina (C2, C3, C4). Luego se eliminan las interacciones complementarias para que solo se formen con la presencia del ion metálico apropiado.

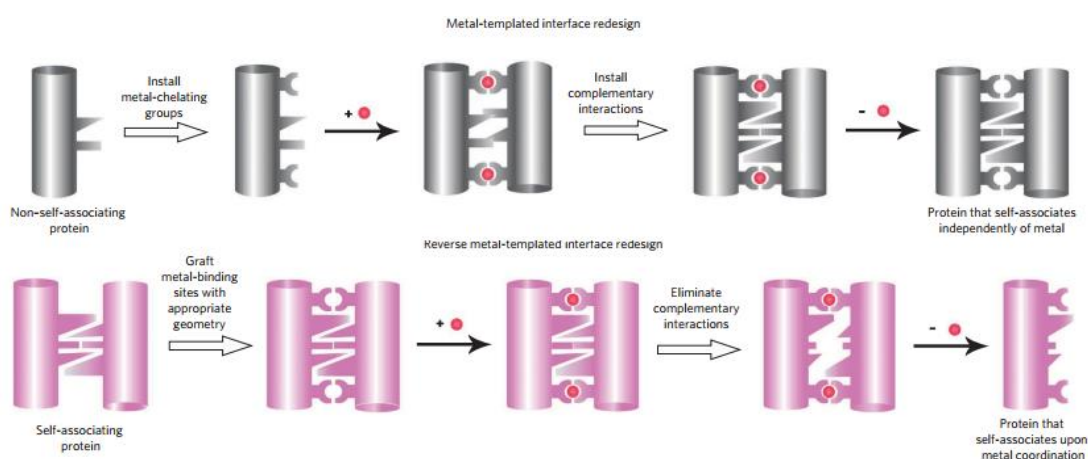


Imagen 10. Diferencias entre MeTIR y rMeTIR, arriba y abajo respectivamente. Los puntos rojos son los iones metálicos. Fuente: [17]

Se ha demostrado que la ferritina modificada a través de rMeTIR en su interfaz C2 se autoensambla en respuesta selectiva a la coordinación del Cu(II) a pH neutro [17].

Se puede observar en la interfaz C2 (Imagen 11-a) que los residuos de histidina (56,60 y 63', 67') se ubican de manera apropiada para relacionarlos simétricamente por coordinación, el residuo 60 es una histidina semi-conservada en la proteína nativa. Es por esto que se utiliza una variante de ferritina recombinante denominada ΔC^* , que carece de residuos de cisteína y tiene la mutación K86Q (donde se sustituye el residuo 86 de Lisina (K) por un nuevo residuo de Glutamina – Q), [17] para facilitar la cristalización, esto es debido a que el monómero de la ferritina nativa es mucho más activa que la mutada [18], pero la diferencia es casi inapreciable en términos de ensamblaje, estabilidad y función. A este tipo de ferritina se le llama 4His- ΔC^* .

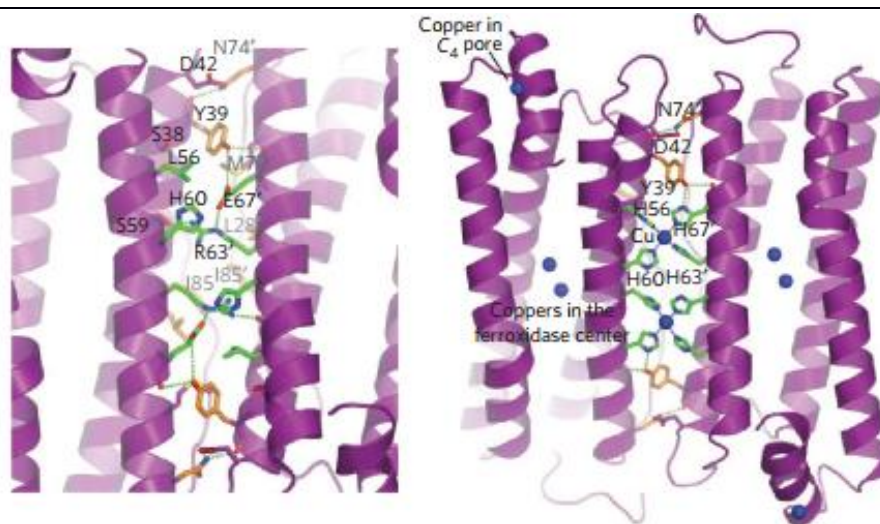


Imagen 11. (a) Interfaz C2 de la ferritina nativa vista desde el interior de la caja. (b) El dímero C2 del Cu-4His-ΔC*. Fuente [17]

Para obtener el 4His-ΔC* se sustituyeron los aminoácidos eliminando así una serie de interacciones hidrofóbicas conservadas y las uniones de puentes de hidrógeno, particularmente aquellas que implican a Arg63 y Glu67 (Imagen 11-b). Las histidinas colocadas no están implicadas en interacciones secundarias, a excepción de His67, que está unido por puente de hidrógeno a Tyr39 en lugar del glutamato.

3.4.4.1. Centros Metálicos

El centro C4 está formado por 4 histidinas de diferentes monómeros. Son un total de 6 centros metálicos unidos por un metal, dichos metales son Cu, Ni y Zn.

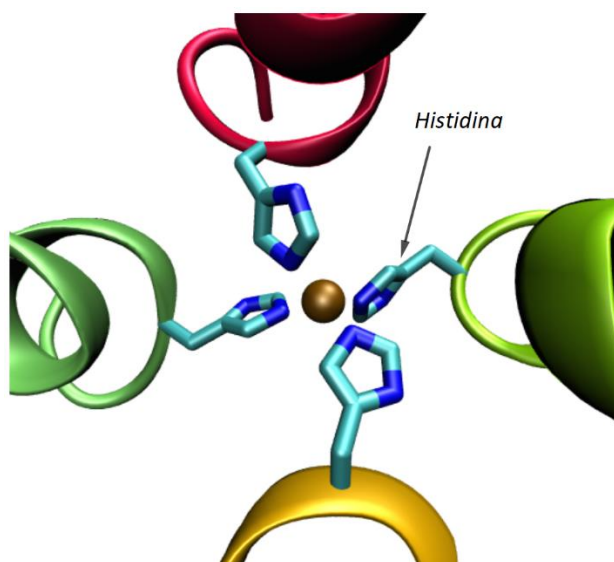


Imagen 12. Centro Metálico C4. Un metal unido a 4 histidinas.

El centro C3 tiene un par de átomos de calcio. Estos metales están enlazados a 3 residuos de glutámico y 3 residuos de aspártico. Cada par de glutámico y aspártico se encuentran en un mismo monómero. Hay un total de 8 centros de este tipo.

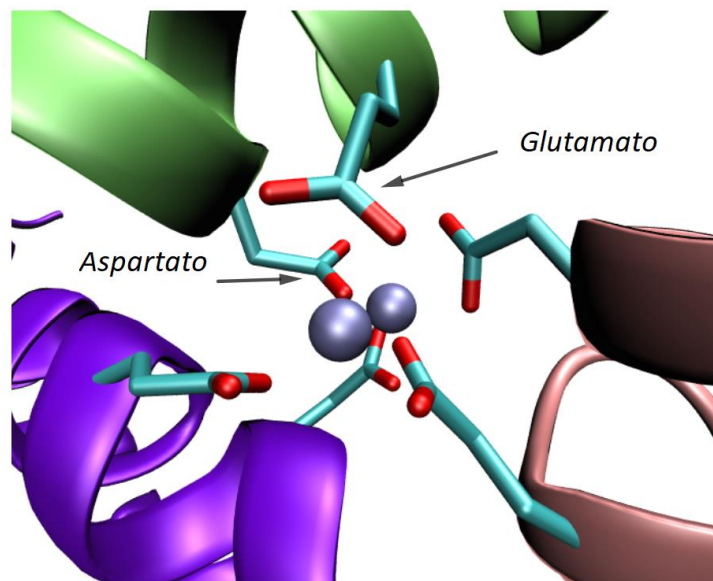


Imagen 13. (a) Centro Metálico C3, dos calcio enlazados a 3 aspárticos y 3 glutámicos.

En el centro C2 hay dos tipos, el primero (C2-A) es parecido al centro C4, formado por 4 histidinas, la diferencia está en que dos residuos de histidina están en un monómero y los otros dos en otro, estos monómeros son paralelos entre sí y están en la parte interior de la ferritina. En cada monómero hay dos centros metálicos C2-A, (Imagen 14-a). Son un total de 24 centros metálicos, y se han modelizado utilizando los metales de Cu, Ni y Zn.

El otro centro (C2-B) –Imagen 14 b- está formado por un calcio enlazado a dos tipos de residuos, un aspártico y una glutamina, situados en diferentes monómeros. Este centro se ubica en la parte superior del C2-A. Son un total de 24 centros.

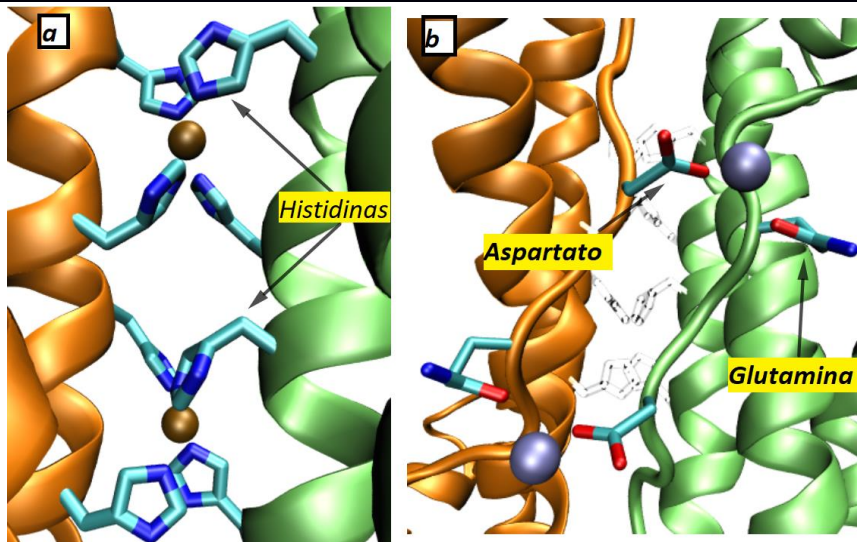


Imagen 14. (a) Centro C2-A, 4 histidinas unidas a un metal. (b) Centro C2-B, una glutamina y un aspártico unidos a un ion calcio.

Por último el centro CM, que está situado en el centro de cada monómero, tiene un doble centro metálico. Un metal está enlazado a dos residuos de glutámico y el otro metal a un glutámico, que ésta compartida con el otro, y una histidina. Estos residuos se encuentran en un mismo monómero; el modelado se ha realizado con los metales de Cu, Ni y Zn.

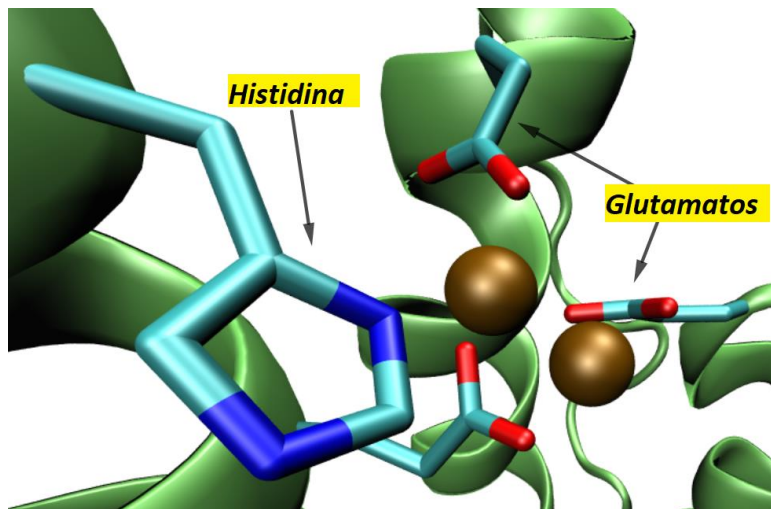


Imagen 15. Centros CM, dos metales unidos a una histidina y 3 glutámicos.

3.4.5. Modificación MIC1

Esta proteína es el resultado de una modificación (mutación) de la proteína 4His- ΔC^* . Cuando se tiene el 4His- ΔC^* , una vez que se incorporaron los sitios de coordinación de baja energía en la interfaz C2 sin perturbar la estructura de la ferritina, se buscó identificar los residuos cuyo reemplazo sería suficiente, pero sin ser excesivo, para desestabilizar esta interfaz de tal manera que todavía podría formarse en la unión con Cu(II). Esta modificación no compromete la alineación de la interfaz nativa C2, que es necesaria para una adecuada orientación adecuada en las interfaces C3 y C4.

Normalmente la ferritina primaria puede soportar muchas modificaciones pero se tiene evidencia de que ciertas mutaciones individuales en sitios clave pueden comprometer la forma de la jaula.

La modificación MIC1 es una variante del 4His- ΔC^* en la interfaz C2 (variante 11 Imagen 16). Esta variante presenta las mutaciones Y39E, N74E y P88A que tiene por objetivo (1) eliminar la red de puentes de hidrogeno nativas que implican a estos residuos sin crear cavidades y (2) introducir interacciones repulsivas entre los residuos Glu39, Glu74 y Asp42 de la interface C2.

	Ferritin variant	Cellular form	Oligomerization state with EDTA	Oligomerization state upon Cu(II) addition
1	ΔC^* (native + K86Q C90E C102A C130A)	Soluble, brown-colored lysate	24-mer	24-mer
2	4His- ΔC^* (ΔC^* + L56H R63H E67H)	Soluble, brown-colored lysate	24-mer	24-mer
3	4His- ΔC^* + Y39D	Inclusion bodies	24-mer	Not determined
4	4His- ΔC^* + Y39K	Soluble, brown-colored lysate	24-mer	Not determined
5	4His- ΔC^* + P88A	Majority in inclusion bodies	24-mer	Not determined
6	4His- ΔC^* + Y39D L28E	Inclusion bodies	24-mer + some monomer	24-mer (major species) + monomer + dimer
7	4His- ΔC^* + Y39D N74E	Inclusion bodies	Monomer	Monomer + dimer + 24-mer
8	4His- ΔC^* + Y39E N74E	Inclusion bodies	Monomer	Monomer + dimer + 24-mer
9	4His- ΔC^* + Y39D L28E N74E	Inclusion bodies	Monomer	Monomer + dimer + mixture of <i>n</i> -mers (no 24-mer)
10	4His- ΔC^* + Y39E N74E I85D	Inclusion bodies	Monomer	Monomer + dimer
11	MIC1 (4His- ΔC^* + Y39E N74E P88A)	Inclusion bodies	Monomer	24-mer
12	MIC1 + H60A	Inclusion bodies	Monomer	Monomer (dimer and 24-mer only at high protein concentrations)
13	MIC1 + H56L H63R H67E (ΔH -MIC1)	Inclusion bodies	Monomer	Monomer
14	MIC1 + H173A	Inclusion bodies	Monomer	24-mer (only at high protein concentrations)
15	MIC1 + D131A E134A	Inclusion bodies	Monomer	24-mer

Imagen 16. Diferentes ensamblajes de varias ferritinas modificadas. Fuente: [17]

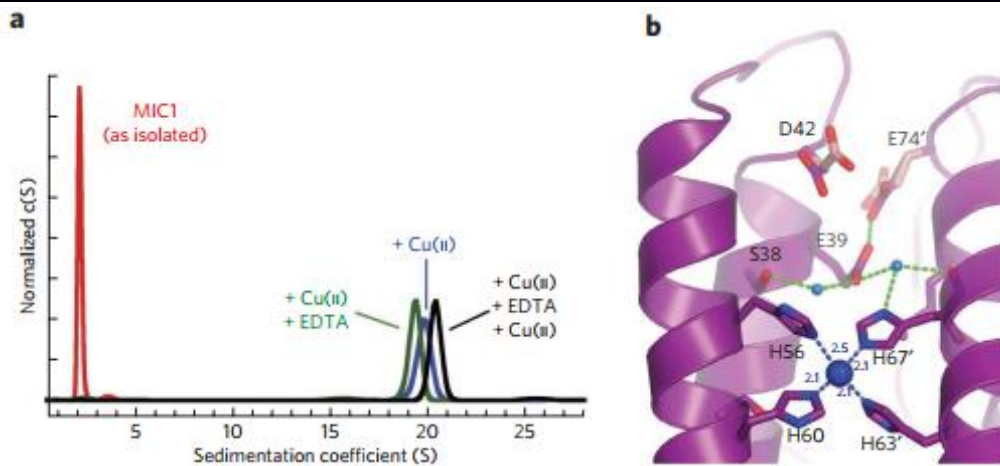


Imagen 17. (a) Velocidad de sedimentación del MIC1 en diferentes estados. (b) Interfaz C2 del MIC1 con las mutaciones Y39E y N74E. Fuente: [17]

3.4.5.1. Centros metálicos

Los centros C4 y C2 (C2-A y C2-B) de esta ferritina tienen la misma forma que en la 4His- ΔC^* , ver apartado 3.4.4.1. Los únicos centros que cambian respecto de la proteína 4His- ΔC^* son el C3 y el CM. En este caso los centros metálicos presentan un solo metal de coordinación enlazado a los residuos de aminoácidos más cercanos de tres monómeros diferentes (C3) y de un solo monómero (CM).

El centro C3 está formado por 3 residuos de glutámico y 3 residuos de aspártico de tres monómeros diferentes, cada glutámico y aspártico se encuentra en un mismo monómero y se enlazan a un mismo metal. Hay un total de 8 centros de este tipo.

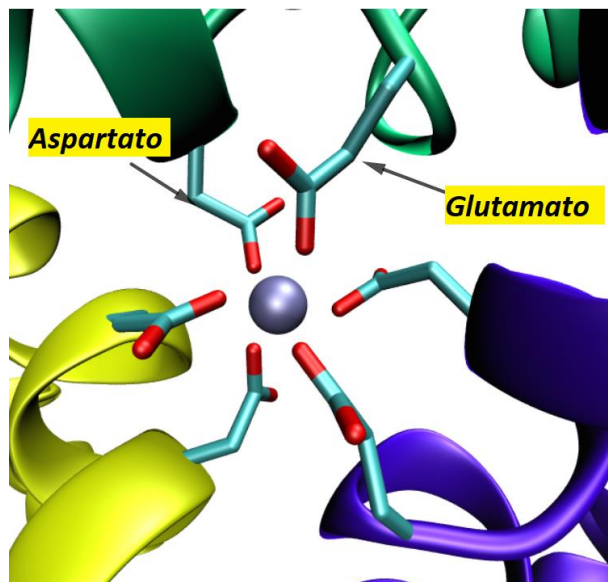


Imagen 18. Centro C3, 3 glutámicos y 3 aspárticos unidos a un metal.

El centro CM tiene un metal y está enlazado a dos residuos de glutámico y una histidina. Estos residuos están enlazados a un mismo monómero. Son un total de 24; los metales usados son Cu, Ni y Zn.

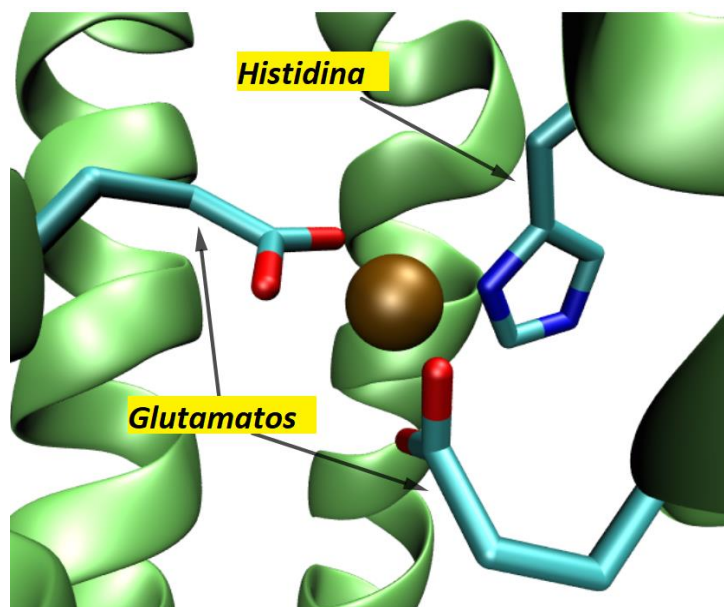


Imagen 19. Centro CM, dos glutámicos y un histidina unidas a un metal.

4. Dinámica molecular

4.1. Concepto General

La dinámica molecular (*Molecular Dynamics* - MD) es una técnica de simulación donde los átomos y moléculas de un sistema interactúan durante un periodo de tiempo determinado, permitiendo una predicción del movimiento de las partículas en ciertas condiciones. Estas simulaciones se emplean con frecuencia en el estudio de proteínas y biomoléculas.

En la simulación de sistemas moleculares complejos, los cuales están formados por un gran número de partículas, se utiliza la dinámica molecular para simular las interacciones químicas entre las diferentes partículas del sistema mediante la utilización de funciones de la mecánica clásica, las cuales tienen un costo computacional más barato que la de la mecánica cuántica y su eficacia depende de la elección de diferentes algoritmos basados en aproximaciones.

4.1.1. Condiciones generales de simulación

En una simulación de MD siempre se tiene un punto de partida prefijado, este se puede determinar y configurar a partir de datos experimentales, o también a partir de un modelo teórico. En cualquier de los casos el sistema requiere un conjunto de velocidades iniciales (temperatura), que son asignadas al azar siguiendo una distribución de tipo Maxwell-Boltzmann.

También se necesitan fijar unas condiciones de simulación, estas son: número de partículas (N), volumen (V), temperatura (T), presión (P) o energía total del sistema (E). Según de cómo se combinen estas condiciones se pueden establecer varias configuraciones de simulación, estas pueden ser:

- Colectividad microcanónica (NVE): Masa, volumen y energía constantes.
- Colectividad microcanónica isotérmico-isobárica (NPT): Masa, presión y temperatura constantes.
- Colectividad microcanónica (NVT): Masa, volumen y temperatura constantes.

Los más usados y comunes son el NVT y NPT, los cuales se han empleado en este trabajo para calibrar el sistema.

4.2. Principios de la Dinámica Molecular

4.2.1. Integración de la Segunda ley de Newton

La simulación de dinámica molecular (MD) se basa en un mecanismo estadístico para generar datos de energía libre de enlace, energía total y cambios conformacionales. Estos valores se calculan de manera

discontinua a cada incremento de tiempo para determinar las nuevas posiciones y el estado de las partículas en el sistema.

Las sucesivas configuraciones (coordenadas y velocidades) del sistema son generadas por la integración de las leyes de movimiento de Newton, las cuales describen dichos movimientos moleculares:

$$f_i = m_i a_i = \frac{\delta V(r^N)}{\delta r_i} \quad (1)$$

Donde la masa del átomo (i) y su aceleración son m_i y a_i , respectivamente, y la fuerza, que actúa sobre i viene dada por la derivada espacial parcial de la función de energía potencial V que depende de las posiciones $r^N = (r^1, r^2, \dots, r^N)$ de todas las N partículas en el sistema, está representada por f_i .

4.2.2. Campos de fuerza

Comúnmente en las simulaciones de dinámica molecular es llamado “campo de fuerza” a la función de la energía potencial que describe todas las interacciones entre las partículas (átomos) del sistema. Esta función considera tanto los términos enlazantes (ángulos y enlaces atómicos) como los no-enlazantes, éstos últimos están formados, por lo general, por la interacción de Van der Waals (VdW), que están constituidos por el potencial de Lennard Jones, y por las interacciones electrostáticas donde se emplea la ley de Coulomb.

Los campos de fuerza no tienen en cuenta los cambios electrónicos en los orbitales moleculares (partículas cuánticas) ya que los átomos son considerados como partículas clásicas individuales, esto permite simplificar los cálculos, pero estos cambios son importantes cuando los átomos se combinan para formar nuevas moléculas (rotura y formación de enlace). La MD no puede utilizarse en este último caso.

Las ecuaciones que se emplea en el campo de fuerza presentan una serie de parámetros que se ajustan para reproducir experimentos y cálculos de una alta complejidad estructural. Las biomoléculas, como pueden ser azúcares, proteínas, ADN y lípidos generalmente se parametrizan en el campo de fuerza al llevar a cabo la simulación por dinámica molecular.

En general, los campos de fuerza utilizan funciones clásicas sencillas para las interacciones atómicas. Así, por ejemplo, el programa AMBER [1] utiliza la siguiente ecuación simplificada como campo de fuerza:

$$\begin{aligned}
U(\vec{R}) = & \sum_{\text{enlace}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{angulo}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{\text{diedros}} K_\chi(1 + \cos(n\chi - \delta)) + \sum_{\text{impropios}} K_{imp}(\varphi - \varphi_0)^2 \\
& + \sum_{\text{noenlace}} \epsilon \left[\left(\frac{R_{min\,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min\,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_1 r_{ij}}
\end{aligned} \quad (2)$$

Donde K_b , K_θ , K_χ , y K_{imp} son las constantes de fuerza del enlace, ángulo, ángulo diedros y el ángulo diedro impropio, respectivamente. Por otro lado b , θ , χ y φ son la longitud de enlace, ángulo de enlace, ángulo diedro y ángulo diedro impropio de torsión, respectivamente, el subíndice cero representa los valores de equilibrio para los términos individuales. Los términos de Coulomb y Lennard-Jones (6-12) contribuyen a las interacciones externas o no enlazantes; ϵ es la profundidad del pozo Lennard-Jones y R_{min} es la distancia en el mínimo de Lennard-Jones, q_i es la carga atómica parcial, ϵ_1 es la constante dieléctrica efectiva, y r_{ij} es la separación entre cargas.

$$\begin{aligned}
U = & \sum_{i < j} \sum 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
& + \sum_{i < j} \sum \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \\
& + \sum_{\text{bonds}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 \\
& + \sum_{\text{angles}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{\text{torsions}} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)]
\end{aligned}$$

Imagen 20. Función de la energía potencial para las interacciones moleculares en la aproximación de mecánica molecular. Fuente: [19]

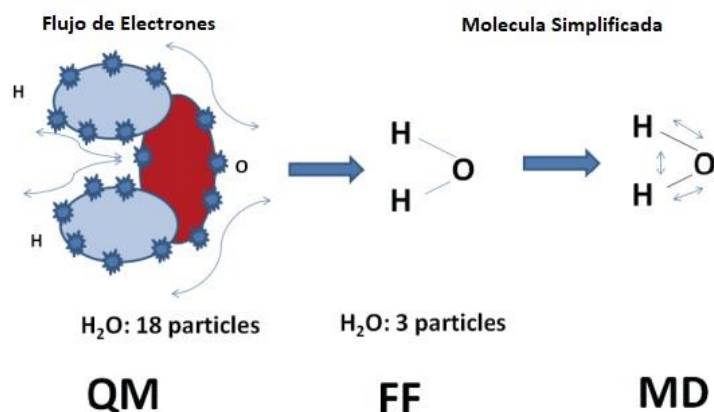


Imagen 21. Una representación simple del Force Field (FF), que es la base de los estudios de mecánica cuántica (QM). El FF simplifica la cantidad de partículas requeridas para las simulaciones de MD. Fuente: [20]

Según se puede ver en la (2) la energía depende de las propiedades enlazantes (longitud del enlace, de los ángulos, diedros) y las no enlazantes (interacciones electroestáticas y de Van der Waals).

4.2.3. Condiciones de contorno

El recipiente que se genera para realizar la simulación, que puede contener soluto (biomoléculas, etc.) y solvente (generalmente agua) tiene cierta limitación si se considera un sistema finito, debido a que las moléculas chocan con las paredes del sistema al escapar de la región de simulación, es por ello que se emplean condiciones periódicas de contorno donde el sistema se expande de forma tridimensional de forma periódica mediante algoritmos matemáticos PBC (*Periodic Boundary Conditions*). Con este método se llenan los espacios de copias idénticas en la región de simulación. Esto conlleva a que si un átomo sale de la región de simulación por una cara se reemplazara por otra que tenga la misma velocidad entrando por la cara opuesta.

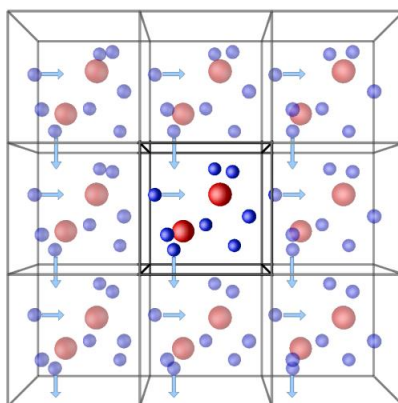


Imagen 22. Representación del método de condiciones periódicas de contorno.

Fuente: <http://isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.html>.

4.3. Programas informáticos de MD

Hay varios campos de fuerza que pueden arrojar diferentes resultados, dependiendo de la parametrización empleada, por lo que la elección del campo de fuerza normalmente depende de la investigación realizada debido a que no suele haber mucha información sobre éstos. Es por esto que existen programas informáticos que tienen campos de fuerza con diversas características que aceptan una o varios tipos de biomoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y complejos ligando-proteína.

Las suites más famosas de simulación son CHARMM, AMBER, GROMACS y NAMD. Estas se diferencian en sus funciones de capacidad, rendimiento, procesamiento de datos y adaptabilidad a hardware nuevo, como el implementar unidades de procesamiento gráfico (GPU) que permiten producir simulaciones más rápidas.

Otra característica importante es la simulación de dinámica molecular con partículas de agua ya que hace que el sistema sea lo más realista posible, al contrario que al vacío o en un ambiente acuoso implícito, porque el agua influye en la conformación de la proteína. Por esto es importante que se incluya en el modelo la opción de solvente explícito o el implícito (metodología Generalized Born - GB). El modelo de solvente explícito es el mayormente usado, los programas en donde se pueden encontrar son el CHARMM y AMBER, entre otros.

4.4. AMBER

Es una suite informática la cual engloba un conjunto de programas que permiten realizar simulaciones de dinámica molecular, concretamente en biomoléculas. Estos programas se complementan entre ellos por lo que nos encontramos con un sistema en donde se pueden realizar muchos cálculos en común. Así mismo el término AMBER también se emplea para referirse a los campos de fuerza implementados en dicho paquete y que se emplean para llevar a cabo la simulación.

Para entender cómo funciona AMBER (AmberTools16 y Amber16) y como se interrelacionan los diferentes programas del paquete entre ellos, Imagen 23, primero se necesita entender que información es necesaria en los programas de simulación (sander, pmemd, mdgx o nab) para saber de dónde proviene y como se puede integrar en los programas.

Información que necesitan todos los programas de simulación (los círculos en la Imagen 23):

1. Coordenadas cartesianas para cada átomo en el sistema. Estos generalmente provienen de cristalografía de rayos X, espectroscopia de RMN o construcción de modelos. Por lo general, deben estar en formato PDB (Protein Data Bank)[21]. El programa LEaP proporciona una plataforma para realizar este modelado.

2. Topología: Conectividad, nombres de átomos, tipos de átomos, nombre de residuos y cargas. Esta información proviene de la base de datos de AMBER. Contiene topología para los aminoácidos estándar, así como para los aminoácidos cargados con terminal N y C, ADN, ARN y azúcares y lípidos comunes.
3. Campo de fuerza: Parámetros para todos los enlaces, ángulos, diedros y tipos de átomos en el sistema. Estos archivos se pueden, de forma estándar, usar para proteínas y ácidos nucleicos, también se pueden preparar archivos propios modificando los campos de fuerza estándar.
4. Una vez que se crean los archivos de topología y coordenadas (llamados prmtop y prmcrd por defecto), el script *parmed* se emplea para examinar y verificar éstos para realizar modificaciones.
5. Comandos: el usuario especifica las opciones de procedimiento y los parámetros de estado deseados. Estos se especifican en archivos de entrada escritos en el lenguaje NAB.

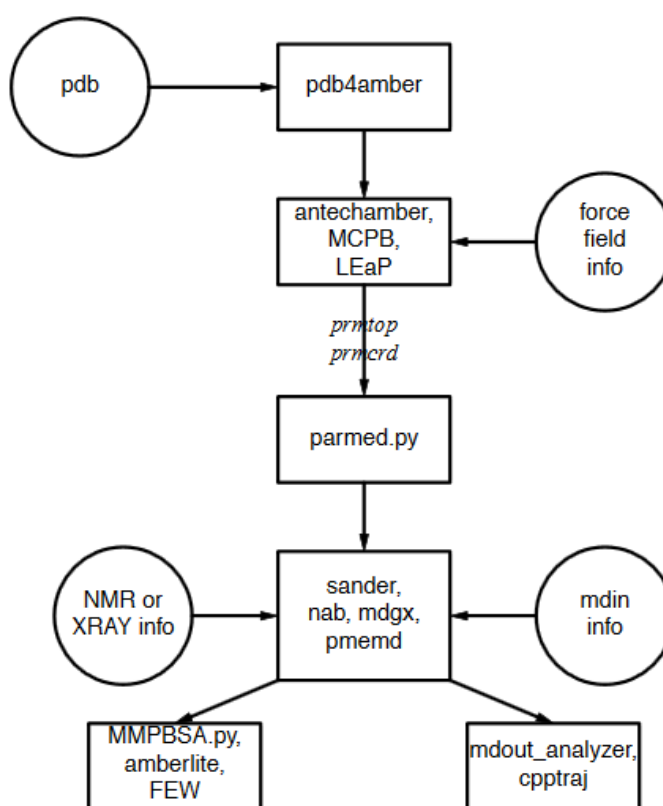


Imagen 23. Diagrama de flujo del funcionamiento de AMBER. Fuente: [22]

Los programas encuadrados en la línea de puntos son los preparatorios para construir la molécula o el sistema a estudiar. A continuación solo se explicaran los programas más importantes.

4.4.1. Programas preparatorios

LEaP es el programa principal para crear un nuevo sistema en *Amber* o para modificar los sistemas existentes. Está disponible como el programa de línea de comandos *Tleap* o GUI *xleap*.

pdb4amber generalmente ayuda a preparar archivos en formato pdb provenientes de otros lugares (como rcsb.org) para que sean compatibles con LEaP.

parmed proporciona una forma simple de extraer información sobre los parámetros definidos en un archivo de topología de parámetros.

antechamber es el programa principal para desarrollar campos de fuerza para moléculas similares a las drogas o aminoácidos modificados utilizando el campo de fuerza general de Amber (GAFF).

4.4.2. Programas de simulación

Sander es un programa básico de minimización de energía y dinámica molecular. Este programa relaja la estructura moviendo iterativamente los átomos hasta que se obtiene una energía baja del sistema. La dinámica molecular genera configuraciones del sistema al integrar ecuaciones de movimiento newtonianas y permite que el sistema llegue a energías potencialmente pequeñas. Estas configuraciones se pueden en intervalos regulares para ser analizadas después.

pmemd es una versión de *Sander* que esta optimizada para ejecutar la simulación en paralelo, la variante pmemd.cuda se ejecuta en una unidad de procesamiento gráfico, normalmente conocida como GPU (*Graphics Processing Unit*), que permite realizar cálculos más rápidos .

4.4.3. Programas de análisis

cpptraj es el programa principal para el análisis de trayectoria, escrita en C++, para realizar superposiciones, extracciones de coordenadas, cálculo de valores de enlace, ángulo, diedro, fluctuaciones posicionales atómicas, funciones de correlación, análisis de puentes de hidrogeno, etc.

5. Metodología

5.1. Simulación

5.1.1. Sistema de Partida

Este trabajo se ha realizado partiendo de los archivos de parámetros (pmrtop) y coordenadas (inpcrd) de los sistemas 4His- ΔC^* y MIC1. En ambos sistemas se ha usado los parámetros del campo de fuerza “ff03.r1” [23], [24] del AMBER para las moléculas de soluto y los residuos proteicos. Y todo esto sobre agua explícita usando el modelo TIP3P.

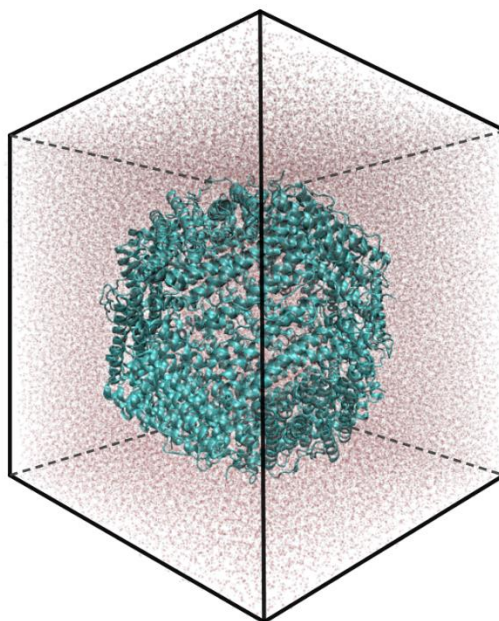


Imagen 24. Caja ortogonal de simulación. Se puede ver el sistema de la ferritina rodeada de moléculas de agua.

Por lo tanto como punto de partida tenemos una caja ortogonal donde están los residuos que conforman la jaula de la ferritina rodeada de moléculas de agua.

En el sistema 4His- ΔC^* hay un total de 290876 átomos, 4128 residuos de soluto y 74806 moléculas de agua que actúan como solvente. Y en el MIC1 hay un total de 316687 átomos, 4128 residuos de soluto y 83223 aguas.

Previamente se ha hecho una serie de pasos para equilibrar los sistemas antes de empezar la producción. Para ello se necesitan tres tipos de archivos:

Archivo pmrtop: es este archivo contiene la descripción de la topología molecular y los parámetros necesarios del “fore filed”.

Archivo Inpcrd (or restrt): es un archivo que contiene la descripción de las coordenadas y velocidades de los átomos.

Archivos de entrada: consiste en una serie de lista de comandos y variables de control que determinan las opciones y el tipo de simulación que se va a ejecutar. Con estos archivos de entrada se ejecutaran los comandos necesarios en cada proceso.

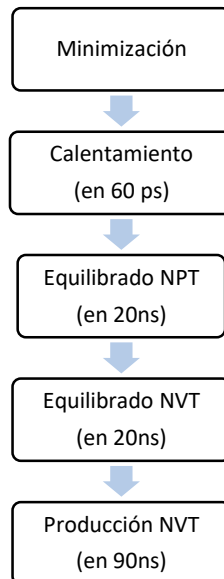


Imagen 25.Esquema de todos los pasos que se han hecho, desde la minimización hasta la producción.

A continuación se presentan los diferentes archivos de entrada que se han empleado para calibrar los sistemas.

5.1.2. Minimización

Inicialmente el sistema tiene una energía potencial más alta de la normal es por esto que se realiza una minimización de la energía, es decir se calculan las posiciones y fuerzas originales para que la simulación sea lo más realista posible. En esta etapa se intenta reducir las posibles colisiones iniciales de átomos que hagan elevar la energía potencial de todo el sistema.

```

Initial minimisation of our structure
&cntrl
imin=1, maxcyc=15000, ncyc=7000,
cut=10, ntb=1,
/
  
```

IMIN = 1 Realiza una minimización de la energía.

MAXCYC = 15000 Es el número máximo de ciclos de minimización.

NCYC = 7000 Es el método de minimización, de 0 – NCYC se aplica el algoritmo de descenso más inclinado y después de NYCY – MAXCYC cambia el algoritmo al de gradiente conjugado.

CUT = 10 Se usa para especificar la distancia limite máxima para considerar las interacciones no enlazante en Angstroms.

NTB = 1 Esta variable controla si las condiciones periódicas de contorno se imponen o no en el sistema durante el cálculo de las interacciones no enlazantes. En este caso a volumen constante.

5.1.3. Calentamiento

Una vez se ha minimizado el sistema se procede a calentarlo, para darle movimiento a las moléculas del sistema (temperatura), primero de 0K hasta 150K luego de 150K hasta 400K y por último reducimos hasta 298K, durante 60ps utilizando el termostato de *langevin*.

```
Heater to 298K MD
&cntrl
  imin=0, irest=0, ntx=1,
  nstlim=60000,dt=0.001,
  ntc=2,ntf=2,
  cut=10, ntb=1,
  ntt=3, tempi=0.0, temp0=298.0, gamma_ln=5.0,
  ntwe=1000, ntwx=60000, ntp=500,ntwr=1000
  ntr=1, restraint_wt=20.0, restraintmask=':1-4250',
  nmropt=1
/
&wt TYPE='TEMP0', istep1=0, istep2=15000,
value1=0.1, value2=150.0
/
&wt type='TEMP0', istep1=15001,istep2=20000,
value1=150.0, value2=150.0
/
&wt type='TEMP0', istep1=20001,istep2=35000,
value1=150.0, value2=400.0
/
&wt type='TEMP0', istep1=35001,istep2=40000,
value1=400.0, value2=400.0
/
&wt type='TEMP0', istep1=40001,istep2=45000,
value1=400.0, value2=298.0
/
&wt type='TEMP0', istep1=45001,istep2=60000,
value1=298.0, value2=298.0
/
&wt TYPE='END'
/
```

IMIN = 0 Ejecuta la dinámica molecular sin minimización.

IREST = 0 No continua la simulación, las velocidades anteriormente generadas se ignoran y se restablece a cero.

NTX = 1 Se leen las coordenadas pero no las velocidades.

NSTLIM = 60000 Es el número de pasos de MD a realizar. El total de tiempo se calcula $NSTLIM \cdot DT$.

DT= 0.001 Es el paso del tiempo en pico segundos.

NTC = 2 Realiza restricciones de longitud de enlace mediante el programa SHAKE. Los enlaces que involucran al hidrogeno están restringidos.

NTF = 2 Se congelan los hidrógenos. No se consideran las interacciones de enlace con átomos de H.

NTT = 3 Asignación del termostato. Utiliza la dinámica de Langevin con la frecuencia de colisión y dada por γ_{ln} para mantener la temperatura constante.

TEMPI = 0.0 Temperatura inicial, las velocidades se asignan desde una distribución de Maxwell.

TEMPO=298.0 Temperatura de referencia a la que se mantendrá el sistema.

GAMMA_LN = 5.0 Es la frecuencia de colisión del termostato de Langevin y en ps^{-1} , cuando $ntt=3$.

NTWE = 1000 Cada pasos de $ntwe$ las energías y las temperaturas se escribirán en el archivo "*mden*" después de determinados pasos.

NTWX = 60000 Cada pasos de $ntwx$ se escribirán las coordenadas se escribirán en el archivo "*mdcrd*".

NTPR = 500 Cada pasos de $ntpr$ se escribirá la información energética en los archivos "*mdout*" y "*mdinfo*".

NTWR = 10000 Cada pasos de $ntwr$ se escribirá un archivo "*restrt*".

NTR = 1 Restringe las posiciones de unos átomos específicos utilizando un potencial armónico. Los átomos vienen definidos en **RESTRAINTMASK**.

RESTRAINT_WT = 20.0 Es el peso para las restricciones posicionales.

RESTRAINTMASK = '1-4250' Es la cadena que especifica el contenido de átomos restringidos.

NMROPT=1 Se leerán las restricciones NMR y cambios de peso.

Las siguientes 7 líneas permiten que el termostato cambie su temperatura objetivo durante la simulación. Primero se eleva la temperatura de 0K hasta 150K los 15000 primeros pasos. Luego la temperatura (150K) se mantendrá en los pasos 15001 hasta 20000 (500 pasos de diferencia). Se repite este proceso hasta los 400K y luego se reduce la temperatura hasta 298K. Este proceso permite distribuir uniformemente las moléculas de agua en la caja ortogonal de simulación.

5.1.4. Equilibrado NPT

Ahora procedemos a equilibrar el sistema a presión constante durante 20ns, hasta una densidad uniforme.

```
NPT Equilibration to 298K and 1atm.
&cntrl
  imin=0, irest=1, ntx=5,
  nstlim=1000000,dt=0.002,
  ntc=2,ntf=2,
  cut=10, ntb=2,
  ntt=3, gamma_ln=1.0,
  temp0=298.0,
  ntp=1,taup=2.0,
  ntwe=25000, ntwx=25000, ntp=5000,
/
```

IREST = 1 Reinicia la simulación leyendo las coordenadas y velocidades de un archivo de reinicio previamente guardado.

NTX = 5 Las coordenadas y las velocidades se leerán desde un archivo de coordenadas tipo NetCDF o ASCII.

NTP = 1 Control de presión con escala de posición isotrópica.

TAUP = 2.0 Tiempo de relajación de la presión (en ps) cuando NTP > 0.

5.1.5. Equilibrado NVT

Se hace otro equilibrado al sistema con el conjunto de parámetros NVT, parecidos al equilibrado anterior, en 20ns.

```
NVT Production run to 298K
&cntrl
  imin=0, irest=1, ntx=5,
  nstlim=1000000,dt=0.002,
  ntc=2,ntf=2,
  cut=10, ntb=1,
  ntt=3, gamma_ln=1.0,
  temp0=298.0,
  ntwe=10000, ntwx=10000, ntp=5000,ntwr=10000
/
```

5.1.6. Producción NVT

En este paso se hacen los cálculos de movimiento del sistema a lo largo del tiempo, en este trabajo se harán hasta 90ns.

```
NVT Production run to 298K
&cntrl
  imin=0, irest=1, ntx=5,
  nstlim=5000000, dt=0.002,
  ntc=2, ntf=2, ig=-1, iwrap=1
  cut=10, ntb=1,
  ntt=3, gamma_ln=1.0,
  temp0=298.0,
  ntwe=10000, ntwx=10000, ntp=5000, ntwr=10000
/
```

IWRAP = 1 Las coordenadas escritas en los archivos de reinicio y trayectoria se circunscriben en la celda unitaria de la caja periódica.

Esto significara que para cada molécula, su imagen periódica más cercana al centro de la “caja primaria” (con coordenadas x entre 0 y a, coordenadas y entre 0 y b y z coordenadas entre 0 y c) será la que se escribe en el archivo de salida.

Para ejecuciones muy largas, es necesario activarlo para evitar que la salida de coordenadas desborde la trayectoria y reiniciar formatos de archivo.

IG = -1 Es una semilla que sirve como generador de números pseudoaleatorios. La velocidad de inicio del MD depende de la semilla del generador. La semilla aleatoria se basara en la fecha y hora actual, por lo que será diferente en cada ejecución.

5.2. Extracción de Datos

Cuando se haya realizado la simulación se procederá a extraer los datos de los centros metálicos. Se han analizado un total de 84 centros (ver Anexo A), para hacerlo se ha recurrido al programa Cpptraj para hacer el tratamiento de datos que proporciona Amber16.

Cpptraj [25] es un programa para procesar trayectorias de coordenadas y archivos de datos, en este caso trayectorias tipo NetCDF. Las trayectorias NetCDF (*Network Common Data Form*) es un tipo de trayectorias binarias que pueden almacenar velocidades y fuerzas, y registrar el paso de tiempo. Para saber cómo funciona cada comando ir al apartado anexo.

Para los diferentes centros metálicos y sus correspondientes esferas de coordinación se extraerán los datos de la geometría molecular (distancias, ángulos y diedros) que forman los iones metálicos con sus ligandos (átomos de los residuos a los que se enlazan).

Por otro lado, para estudiar las interacciones entre los centros metálicos y otros átomos y/o moléculas (aguas) que no están enlazados de manera directa, se usará función de distribución radial. Esta va a permitir estudiar la primera esfera de solvatación de los iones metálicos. Por otra parte, también se van a estudiar los puentes de hidrógeno que se forman entre los diferentes residuos de monómeros diferentes.

5.2.1. Desviación media cuadrática

Antes de hacer la extracción de datos se ha realizado la desviación media cuadrática para saber en qué momento las moléculas del sistema se empiezan a estabilizar.

La RMSD (*Root-mean-square deviation*), “desviación cuadrática media”, es una medida cuantitativa utilizada para la similitud de entre dos coordenadas atómicas superpuestas [26]. En otras palabras, mide la desviación de una estructura respecto a otra de referencia. El valor del RMSD se da en Å y se calcula por:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N [m_i \cdot (X_i - Y_i)^2]}{M}} \quad (3)$$

Dónde:

N es el número de átomos

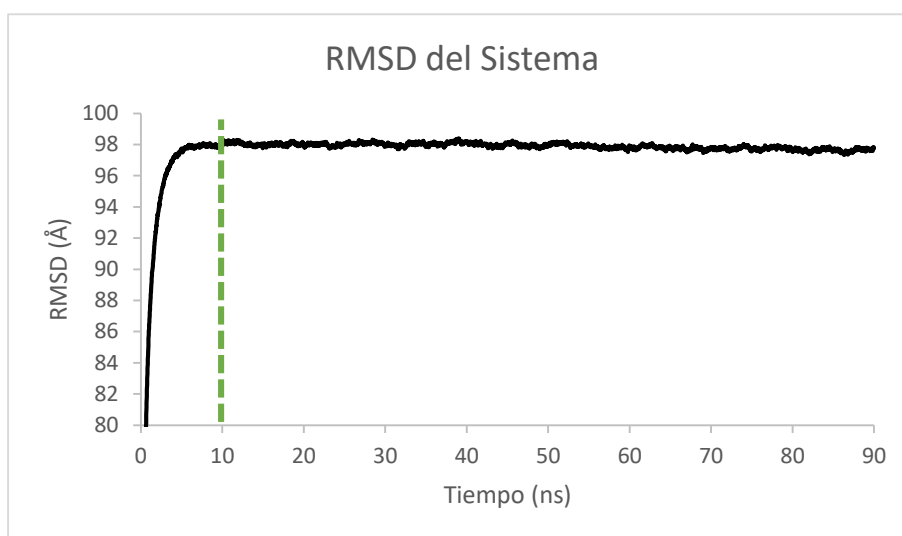
m_i es la masa del átomo i

X_i es el vector de coordenadas para el átomo objetivo i

Y_2 es el vector de coordenadas para el átomo de referencia i

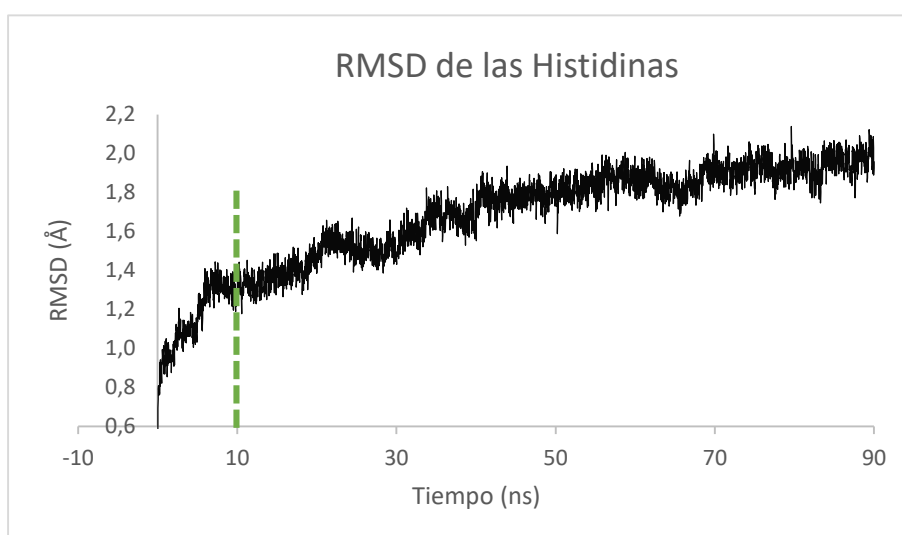
M es la masa total

En todos los casos el sistema se estabilizó aproximadamente en los 10ns, como se puede ver en la Gráfica 1, donde apenas hay una variación del 0,2Å.



Gráfica 1. *RMSD de todo el sistema, el movimiento de las moléculas se estabiliza en los 10ns.*

También se realizó una RMSD de las histidinas para comprobar su estabilidad en el sistema.



Gráfica 2. *RMSD de las histidinas, se puede ver que a partir de los 10ns apenas varían en 0,5 Å.*

5.2.2. Distancias de enlace

Se han medido la distancia de los enlaces entre el ion metálico de cada centro y el átomo al que está enlazado, se hallan las distancias para comprobar la estabilidad del enlace. También en todas las mediciones de enlace se ha hallado la desviación típica con tres cifras decimales.

Para los centros C4 y C2-A, debido a que tienen la misma estructura, se ha hecho el mismo tipo de promedio. Se ha considerado la misma distancia entre metal – histidina de todos los centros metálicos. Por lo tanto se ha realizado una única distancia promedio. En los otros centros, se ha considerado

diferente cada distancia metal – residuo de cada centro metálico. Por lo tanto se ha hecho un promedio para cada tipo de distancias de todos los centros metálicos. También se midieron, en los centros C2, las distancias entre metal-metal (C2-A) y calcio-calcio (C2-B y C3).

5.2.3. Ángulos de enlace

Se han hallado los ángulos de enlace que forman los átomos que se enlazan el ion metálico, para determinar los ángulos siempre se ha considerado como vértice el ion metálico, en los centros que tienen varios enlaces solo se han cogido los ángulos que se han considerado importantes. Esta medición se ha hecho para comprobar la estabilidad estructural del centro metálico.

Cada ángulo que se ha medido en los diferentes centros metálicos se han considerado como diferente posteriormente se hizo un promedio entre todos los centros metálicos que tenían el mismo tipo de Ángulo. También se ha hallado la desviación típica de cada ángulo de enlace con tres cifras significativas.

5.2.4. Ángulos Diedros

Se han hallado los ángulos diedros que forman los iones metálicos con los átomos enlazantes, para determinar el ángulo diedro se ha cogido el ion metálico, como la arista en común entre los planos, y los tres átomos enlazantes como el resto de puntos del plano. Esta medición se hace para comprobar la estabilidad de la estructura del centro, el ángulo diedro se complementa con el ángulo de enlace.

Cada ángulo diedro medido se ha considerado como diferente en cada centro metálico, posteriormente se ha hecho el promedio del mismo tipo de diedro en todos los centros, se han cogido los diedros más importantes para que se puedan apreciar mejor. Se ha hallado la desviación típica de cada ángulo diedro con tres cifras significativas.

5.2.5. Función de distribución radial

El RDF “*Radial Distribution function*” se muestra en un histograma donde se indica el número de probabilidad de partículas encontradas en función de la distancia R. Esta función se calcula a partir:

$$\text{Densidad} \cdot \left(\left[\frac{4\pi}{3} (R + dR)^3 \right] - \left[\frac{4\pi}{3} dR^3 \right] \right) \quad (4)$$

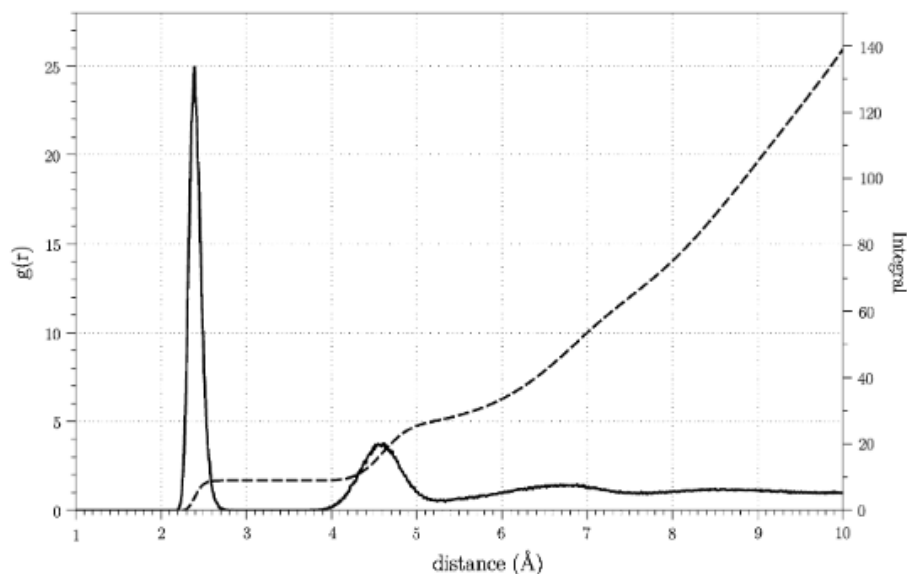
Dónde:

dR es igual al intervalo

Densidad es por defecto $0,033456 \text{ mol}/\text{\AA}^{-3}$, que corresponde al agua en $1,0 \text{ g/mL}$.

Para hallar la cantidad de aguas que tienen una atracción electrostática con cada centro metálico se ha usado la función de distribución radial. Para empezar se fijó un radio máximo de 12\AA con un intervalo $dR=0,05$. Se hizo en todos los centros metálicos para encontrar la cantidad de moléculas de agua coordinadas al ion metálico, es importante determinar si el ion se coordina con las moléculas de agua ya que su estabilidad depende de ella.

Cuando se obtiene la RDF (Gráfica 3- línea solida) se ubica el primer máximo para determinar la distancia del radio de solvatación y luego ubicamos el primer mínimo para encontrar la cantidad de aguas que se coordinan al ion metálico.



Gráfica 3. Ejemplo del histograma de probabilidad de la distribución radial, la función de distribución radial (línea solida) y su integración (línea punteada). Fuente: [27]

Luego se procede a integrar (Gráfica 3- línea punteada) la función RDF para determinar el número de aguas que atraen los iones metálicos. En ese punto se determina la primera esfera de solvatación y por lo tanto se determinan el número de aguas coordinadas al centro metálico.

En la Imagen 26 se puede ver una ilustración de la primera esfera de solvatación que presenta un ion. Las moléculas que están dentro del círculo punteado son considerados aguas de coordinación, esta coordinación se produce cuando los vectores r_{OHA} y r_{OHB} se encuentran a lo largo de los enlaces O-H dando así el vector r_{OO} que une al ion con la molécula de agua.

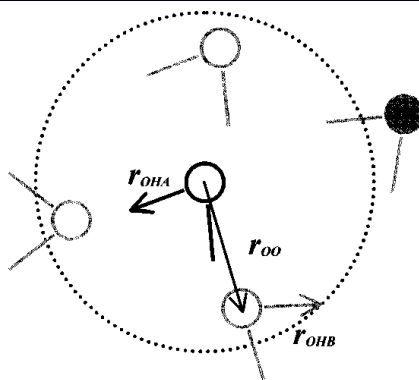


Imagen 26. Ilustración de la solvatación de un ion, el círculo punteado es la primera esfera de solvatación, el ion es el círculo central, los círculos blancos son aguas de coordinación y el círculo negro es el que no tiene coordinación, molécula de solvatación. Fuente: [28]

5.2.6. Puente de hidrogeno

Los puentes de hidrogeno es un tipo de enlace que se produce cuando hay una atracción entre un átomo de hidrogeno polarizado y un átomo de oxígeno, flúor o nitrógeno con carga negativa. Este tipo de interacción en una misma molécula puede formar varios puentes de hidrogeno con otras moléculas. El átomo que esta enlazado al hidrogeno, de carga positiva, se conoce como “Donante” y el otro átomo (oxígeno, flúor o nitrógeno) es el “Aceptor”.

Los residuos que componen los monómeros tienden a formar puentes de hidrogeno entre ellos dando estabilidad a la ferritina, por esto es importante determinar la cantidad de puentes de hidrogeno en nuestros sistemas (4His- ΔC^* y MIC1) a estudiar. En este trabajo solo se tendrán en cuenta los puentes de hidrogeno que hay entre los dímeros de la interface C2 (dos monómeros alineados en paralelo) para saber cómo afectan las mutaciones de Tirosina (Tyr) y Asparagina (Asn) en la estabilidad del sistema MIC1.

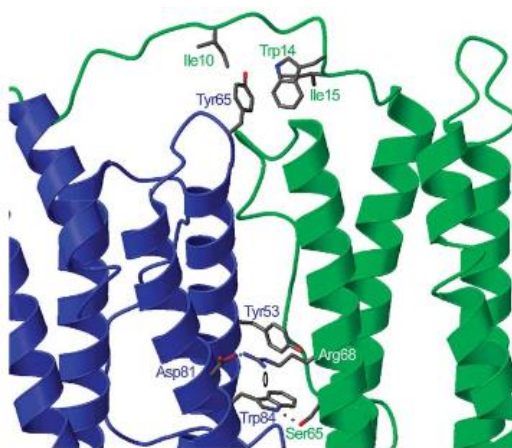


Imagen 27. Residuos que hacen puentes de hidrogeno en el dímero. Fuente: [29]

6. Resultados y Discusión

Se han reunido todos los resultados de los centros metálicos, geometría y distribución radial de los iones, en una tabla para cada metal divalente (Cu, Ni y Zn) del mismo sistema y de los puentes de hidrogeno que hay en cada dímero. Primero se mostraran y explicaran los datos del sistema 4His- ΔC^* y luego los del sistema MIC1, en donde se compararan y discutirán los datos de los dos sistemas.

6.1. Datos de Geometría

Se ha ilustrado la estructura de cada centro metálico para una mejor apreciación, también se han hecho representaciones aproximadas para mostrar la forma en que se han hecho los ángulos, diedros y distancias. Las mediciones de las distancias están en angstroms (Å), con tres cifras significativas, y los ángulos están en grados ($^\circ$), con dos cifras significativas. En todos los datos se ha hecho la desviación típica cogiendo las mismas cifras significativas que el tipo de dato, tres para enlaces y dos para ángulos.

6.1.1. Sistema 4His- ΔC^*

6.1.1.1. Centro Metálico C4

Para determinar la geometría del centro C4 se ha cogido el metal, en la Imagen 28 es el cobre, y los nitrógenos a los que se enlaza. Se han tomado dos ángulos diedros en este tipo de centro (Imagen 28-b), el diedro D1 está formado por los planos rayados (rojo y azul) y el D2 está formado por los planos de color solido (marrón y verde). Los ángulos (Imagen 28-c) que se han cogido son los que se forman entre dos nitrógenos (NE2) y un metal. Las distancias entre histidina y metal se han considerado iguales.

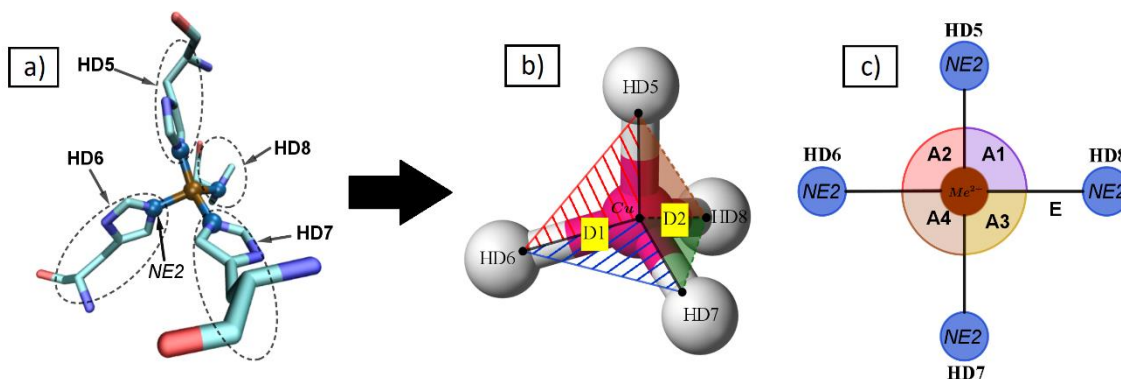


Imagen 28. (a) Estructura del C4 de 4 histidinas enlazadas al cobre. (b) Representación tetraédrica, los diedros D1 y D2 están formados por los planos rayados y sólidos, respectivamente. (c) Esquema simplificado, se pueden ver los ángulos A1-A4 y las distancias -E - entre histidina y metal.

El centro C4 con el cobre (Imagen 28) tiene una estructura tetraédrica achatada. Cuando se enlazan con el níquel presenta una estructura plana cuadrada y con el zinc tiene una estructura tetraédrica distorsionada (balancín).

Los datos de enlaces, ángulos y diedros que se muestran a continuación (Tabla 1 y Tabla 2) son los valores promedio obtenidos a lo largo de la trayectoria de simulación con los diferentes metales divalentes (Cu, Ni y Zn).

Tabla 1. Distancias y ángulos del centro C4 de los sistemas 4His- Δ C*.

Sistema	Distancia (Å)	Ángulo (°)			
		A1	A2	A3	A4
Cu-4His-ΔC*	1,987±0,061	97,23±4,06	99,09±3,78	96,71±3,50	97,44±3,46
Ni-4His-ΔC*	1,911±0,051	89,64±2,26	89,99±2,32	90,57±2,21	90,02±2,22
Zn-4His-ΔC*	1,988±0,061	79,82±3,99	85,10±3,93	82,11±3,81	81,73±3,91

Tabla 2. Ángulos diedros del centro C4 de los sistemas 4His- Δ C*.

Sistema	Diedros (°)	
	D1	D2
Cu-4His-ΔC*	141,87±5,76	140,91±5,70
Ni-4His-ΔC*	176,92±2,28	176,91±2,29
Zn-4His-ΔC*	139,27±4,45	141,17±4,77

Se puede observar que la estructura del C4 en cada metal se mantiene estable. Las distancias son poco menos de 2Å con una desviación típica muy baja, los ángulos y los diedros tienen una desviación típica menos de 6°.

6.1.1.2. Centro Metálico C3

En el centro C3 el átomo del oxígeno del ion carboxilato de cada aspartato (OD1) y glutámico (OE1) están enlazados a los dos calcio (Imagen 29-b). En una vista frontal (Imagen 29-a) se observa que un calcio con tres aspartatos (ASP2, ASP3 y ASP4) forman aproximadamente una pirámide trigonal. De la misma forma, el otro calcio con los 3 glutamatos (GLU1, GLU2 y GLU3) forman una pirámide trigonal pero invertida.

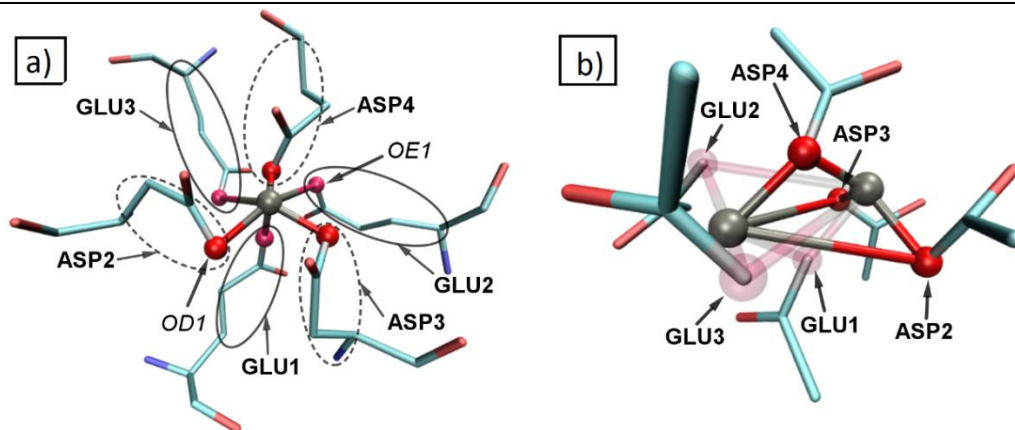


Imagen 29. (a) Vista frontal del C3, se puede ver la forma de pirámide trigonal que forma un calcio (color gris) con los aspartatos y el otro calcio, que está atrás, con los glutamatos. (b) Vista de lado del C3, se puede ver todos los enlaces del GLU y ASP con los dos calcio.

Se han cogido dos ángulos diedros, uno por cada pirámide trigonal (Imagen 30-c). Seis ángulos, formados entre el calcio y dos ligandos, por cada pirámide. En total se localizan 12 enlaces de calcio-ligando.

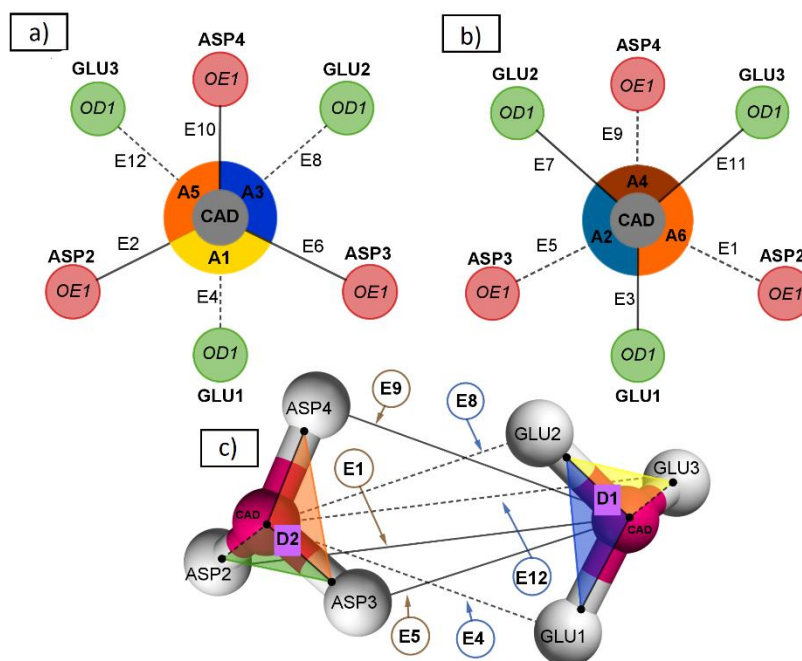


Imagen 30. (a), (b) Representación de la vista frontal y trasera del C3, se puede apreciar los enlaces y ángulos formados entre residuos y calcio. (c) Vista de costado del C3, se puede ver mejor los enlaces calcio-ligando.

Como se puede ver en la Tabla 3 la desviación típica en todos los sistemas son muy bajos por lo que los enlaces son bastante estables. También se observa que hay 2 tipos de tamaños en los enlaces, unos

son cortos que miden desde 1,35 a 1,98Å y los otros son los más largos que miden desde 3,30 a 3,72 Å, siendo los primeros lo que corresponden a la esfera principal de coordinación del metal.

Tabla 3. Distancias E1-E6 del centro C3 de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Distancias (Å)					
	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Cu-4His-ΔC*	3,683 ± 0,149	1,902±0,120	1,544±0,106	1,855±0,076	3,323±0,135	1,763±0,094
Ni-4His-ΔC*	3,722 ± 0,147	1,958±0,115	1,545±0,109	1,833±0,076	3,302±0,136	1,755±0,099
Zn-4His-ΔC*	3,691 ± 0,166	1,916±0,129	1,539±0,115	1,849±0,078	3,321±0,139	1,766±0,097

Tabla 4. Distancias E7-E12 del centro C3 de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Distancias (Å)					
	E7	E8	E9	E10	E11	E12
Cu-4His-ΔC*	1,892±0,171	3,337±0,139	1,934±0,124	1,384±0,117	1,986±0,143	3,500±0,155
Ni-4His-ΔC*	1,834±0,141	3,310±0,137	1,962±0,106	1,351±0,108	1,934±0,129	3,488±0,151
Zn-4His-ΔC*	1,887±0,165	3,319±0,141	1,925±0,127	1,376±0,117	1,998±0,133	3,495±0,167

Solo se han elegido los ángulos que forman las pirámides triangulares para un mejor entendimiento. Se puede ver en la Tabla 5 que la desviación típica del ángulo A1 aumenta hasta 9°, esto es debido a que el ángulo A1 formado en algunos de los centros es un poco diferente que los del resto, es por ello que al hacer la media de estos la desviación estándar aumenta un poco más de lo normal.

Tabla 5. Ángulos del centro C3 de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Ángulos (°)					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Cu-4His-ΔC*	101,03±9,14	106,32±3,98	110,89±3,10	150,99±4,76	128,29±2,86	93,49±3,11
Ni-4His-ΔC*	105,12±6,54	107,57±3,46	109,89±2,90	149,18±3,80	127,74±2,69	93,96±3,03
Zn-4His-ΔC*	100,71±9,28	106,07±3,95	110,84±3,10	151,27±4,63	128,60±2,85	93,21±3,2

En los ángulos diedros (Tabla 6) solo se han tenido en cuenta a los que se forman con las dos pirámides triangulares. Al igual que en los ángulos, la desviación típica de algunos diedros aumenta hasta 12° esto es porque algunos diedros permiten una mayor movilidad entre los átomos enlazados aumentando así la desviación típica al hacer la media de todos éstos.

Tabla 6. Ángulos diedros del centro C3 de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Diedros (°)	
	D1	D2
Cu-4His-ΔC*	124,67±12,38	158,92±4,19
Ni-4His-ΔC*	129,48±9,28	157,97±3,94
Zn-4His-ΔC*	124,44±12,74	158,85±4,19

También se han medido las distancias entre los dos calcio que hay en el centro metálico:

Tabla 7. Distancias entre los dos iones del centro C3 de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Distancia Ca_Ca
Cu-4His-ΔC*	2,767±0,101
Ni-4His-ΔC*	2,762±0,101
Zn-4His-ΔC*	2,757±0,112

La distancia inter-metálica permanece más o menos constante independientemente del sistema metálico simulado, muestra una desviación típica baja.

6.1.1.3. Centro metálico C2

Como se ha dicho antes, el centro C2 une dos pares de hélices de diferentes monómeros, una interior y otra exterior. El hélice interior está unido por dos C2-A (4 histidinas) y el hélice exterior está unida por dos centros C2-B (Ca).

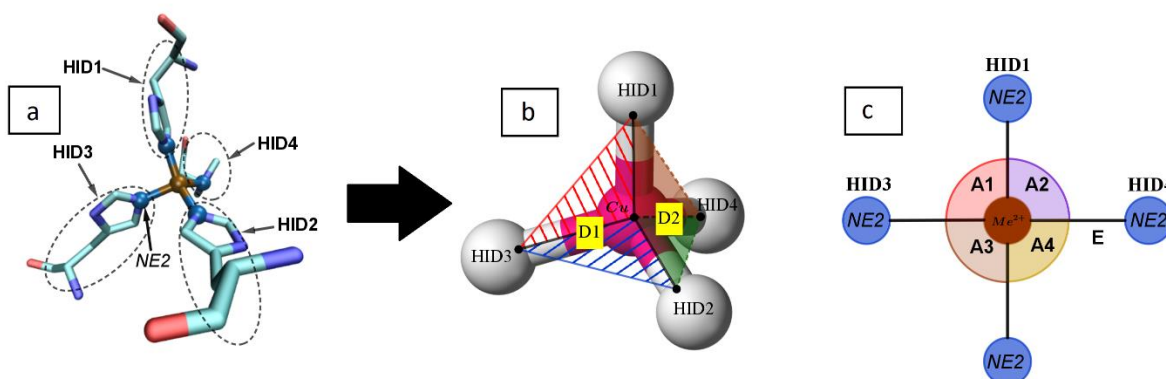


Imagen 31. (a) Estructura de C2-A, un metal enlazado a 4 histidinas. (b) Visualización de los diedros que se forman en el C2-A. (c) Ángulos formados entre metal-ligando.

El C2-A tiene una estructura tetraédrica achatada en todas sus variantes. Se puede ver que su estructura es bastante estable. De distancia tiene aproximadamente 2Å en todos los sistemas

metálicos con una desviación típica muy baja. Los ángulos y diedros muestran una desviación típica inferior de 7°.

Tabla 8. Distancias y ángulos del centro C2-A (4His) de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Distancia (Å)	Ángulos (°)			
		A1	A2	A3	A4
Cu-4His-ΔC*	2,010±0,063	97,26±3,31	88,35±2,93	88,38±2,85	96,39±3,49
Ni-4His-ΔC*	1,914±0,053	93,09±1,95	89,69±1,99	89,65±1,96	91,77±2,16
Zn-4His-ΔC*	2,073±0,075	103,39±3,90	89,15±4,41	89,53±4,31	107,03±4,29

Tabla 9. Ángulos diedros del centro C2-A (4His) de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Diedros (°)	
	D1	D2
Cu-4His-ΔC*	156,03±6,34	155,87±6,29
Ni-4His-ΔC*	164,59±3,71	164,42±3,66
Zn-4His-ΔC*	164,59±3,71	164,42±3,66

El C2-B tiene una estructura más cercana a una T distorsionada. Las distancias son bastante estables, tienen una desviación estándar bastante pequeña.

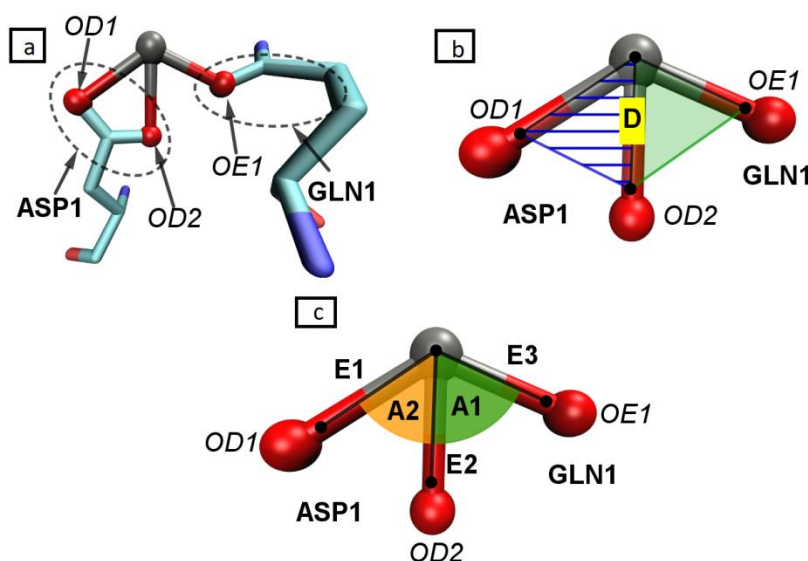


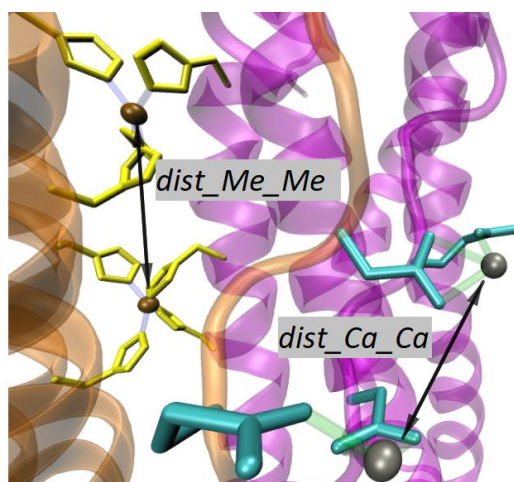
Imagen 32. (a) Estructura C2-B, un aspártico y una glutamina enlazados a un calcio. (b) Ángulo diedro del C2-B. (c) Ángulos y distancias formados entre calcio-ligando.

En los ángulos el A2 es más estable que el A1 ya que la glutamina (GLN1) que esta enlazada al calcio tiene movimientos más bruscos, esto repercute en el ángulo diedro (Tabla 10) aumentando su desviación típica.

Tabla 10. Distancias, ángulos y ángulos diedros del centro C2-B (Ca) de los sistemas 4His-ΔC*.

Metal	Distancia (Å)			Ángulos (°)		Diedros (°)
	E1	E2	E3	A1	A2	
Cu	2,330±0,104	2,416±0,057	2,331±0,105	72,06±4,18	53,98±1,35	163,62±12,32
Ni	2,332±0,102	2,417±0,057	2,330±0,107	72,28±4,19	53,92±1,35	163,59±13,31
Zn	2,329±0,105	2,416±0,056	2,332±0,107	71,42±3,89	53,99±1,34	166,63±10,26

También se han medido las distancias que hay entre cada par de C2-A (4His) y C2-B (Ca) en el centro C2. Se puede ver que no sufre muchos cambios, las distancias entre ellos se mantiene una desviación estándar muy baja.

**Imagen 33. Distancia entre los metales divalentes del centro C2-A (dist_Me_Me) y entre calcio del centro C2-B (dist_Ca_Ca).**

Los resultados de las distancias con los diferentes metales se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 11. Distancias entre metales de los centros C2-A (4His) y C2-B (Ca) de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	C2-A (4His) Dist_Me-Me (Å)	C2-B (Ca) Dist Ca-Ca (Å)
Cu-4His-ΔC*	11,489±0,332	8,796±0,862
Ni-4His-ΔC*	11,832±0,307	8,736±0,890
Zn-4His-ΔC*	11,742±0,317	8,641±0,608

Las distancias inter-metálicas presentan pequeñas variaciones en función del sistema metálico simulado. Así el sistema con cobre muestra menos distancia entre centros C2-A (4His) pero la mayor distancia en los centros C2-B (Ca) con variaciones del orden de 0,3 y 0,15Å, respectivamente. Esto se debe fundamentalmente a la mayor exposición del centro C2-B (Ca) al solvente, ya que se encuentra en la zona más externa de la proteína.

6.1.1.4. Centro metálico CM

El centro CM (Imagen 34) tiene dos iones metálicos, uno está enlazado a dos glutamatos (GLU5, GLU6) y el otro metal está enlazado a dos glutamatos (GLU5, GLU4) y una histidina (HIE1).

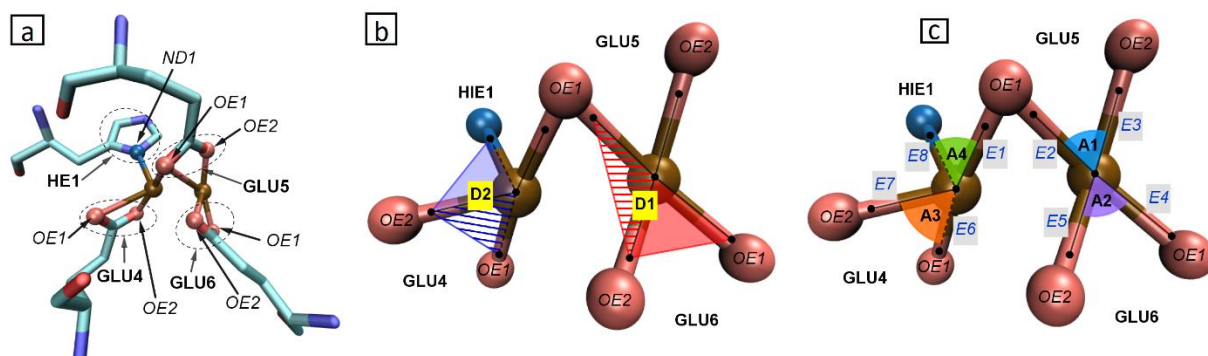


Imagen 34. (a) Centro metálico CM formado por dos metales, tres glutamatos y una histidina. (b) Representación del ángulo diedro del centro metálico. (c) Distancias y ángulos formados en el centro CM.

El centro CM con el cobre tiene dos estructuras tetraédricas distorsionadas, si se coge cada ion metálico por separado. En cambio el níquel tiene una estructura plana cuadrada, en cada ion metálico. Por último el zinc tiene una estructura tetraédrica en un metal (el que se enlaza a una histidina) y en el otro un tetraedro distorsionado. Se puede ver (Tabla 12 y Tabla 13) que las distancias se mantienen estables con una desviación estándar muy baja.

Tabla 12. Distancias E1-E4 del centro CM de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Distancias (Å)			
	E1	E2	E3	E4
Cu4His-ΔC*	1,815±0,048	2,743±0,110	1,793±0,042	1,883±0,041
Ni4His-ΔC*	1,760±0,044	3,268±0,085	1,799±0,045	1,888±0,039
Zn4His-ΔC*	1,811±0,056	3,380±0,088	1,865±0,058	2,060±0,058

Tabla 13. Distancias E5-E8 del centro CM de los sistemas 4His-ΔC*.

Sistema	Distancias (Å)			
	E5	E6	E7	E8
Cu-4His-ΔC*	1,983±0,047	2,249±0,091	1,842±0,043	2,040±0,058
Ni-4His-ΔC*	1,865±0,039	1,890±0,039	1,895±0,041	1,880±0,045
Zn-4His-ΔC*	2,020±0,054	2,037±0,065	2,172±0,072	1,967±0,053

El sistema con cobre presenta una mayor diferencia con respecto a los otros dos sistemas metálicos en las distancias E5 y E7, y mucho más acusado en el ángulo A1, indicando una diferencia de coordinación con los respectivos ligandos en dichos sistemas. Algunos ángulos muestran una desviación típica más grande que otros, esto es porque el sistema presenta unas oscilaciones más bruscas en toda la simulación por lo que hace aumentar su desviación estándar.

Tabla 14. Ángulos del centro CM de los sistemas 4His- Δ C*.

Sistema	Ángulos (°)			
	A1	A2	A3	A4
Cu-4His-ΔC*	51,81 \pm 2,53	66,64 \pm 1,56	63,42 \pm 1,87	98,90 \pm 3,98
Ni-4His-ΔC*	38,86 \pm 1,92	69,68 \pm 1,36	68,99 \pm 1,32	100,49 \pm 2,20
Zn-4His-ΔC*	36,21 \pm 2,12	64,93 \pm 1,55	62,32 \pm 1,73	101,34 \pm 9,95

Al igual que en los ángulos, en los ángulos diedros (Tabla 15) se aprecia mejor la diferencia de coordinación de los centros metálicos en cada uno de los sistemas estudiados. Así se obtiene diferencias de hasta 25 y 88° en los diedros D1 y D2, respectivamente. Las oscilaciones observadas en dichos sistemas se reflejan en un aumento de su desviación típica.

Tabla 15. Ángulos diedros del centro CM de los sistemas 4His- Δ C*.

Sistema	Diedros (°)	
	D1	D2
Cu-4His-ΔC*	137,89 \pm 14,89	98,04 \pm 6,94
Ni-4His-ΔC*	162,02 \pm 8,27	168,96 \pm 4,28
Zn-4His-ΔC*	146,81 \pm 7,74	80,54 \pm 12,68

También se han medido las distancias entre los dos metales que forman el centro CM

Tabla 16. Distancias entre los dos metales del centro CM de los sistemas 4His- Δ C*.

Sistema	Dist Me-Me (Å)
Cu-4His-ΔC*	2,430 \pm 0,195
Ni-4His-ΔC*	3,424 \pm 0,147
Zn-4His-ΔC*	3,320 \pm 0,162

La distancia inter-metálica también muestra la diferencia en la geometría de coordinación entre los sistemas con una mayor proximidad entre los centros de cobre, alrededor de 1Å menor que en los sistemas de Ni y Zn

6.1.2. Sistema MIC1

En este sistema los centros metálicos C4 y C2, C2-A (4His) y C2-B (Ca), son iguales al del sistema 4His- ΔC^* (tienen el mismo número de metales y residuos) los únicos que varían son los centros C3 y CM. El centro C3 del sistema MIC1 pasa a tener un calcio y mantiene los mismos residuos (3 aspartatos y 3 glutaminas), el centro CM del sistema pasa a tener un metal divalente y pierde un residuo, se enlaza a dos glutaminas y una histidina.

6.1.2.1. Centro Metálico C4

Al igual que el anterior sistema (apartado 6.1.1.1), este centro metálico está formado por un metal divalente y cuatro histidinas.

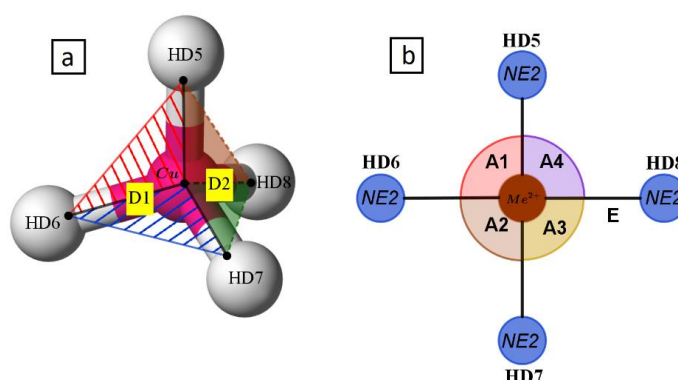


Imagen 35. (a) ángulos diedros del centro C4. (b) Representación simplificada del C4, se indican los ángulos que se forman entre metal-histidina.

Se observó que el cobre presenta una estructura tetraédrica achatada, el níquel tiene una estructura plana cuadrada y el zinc una estructura tetraédrica distorsionada. Los datos de distancia, ángulos y ángulos diedros (Tabla 17 y Tabla 18) generalmente muestran un comportamiento estable con una desviación típica muy baja, los ángulos diedros de los sistemas con cobre y zinc aumentan un poco su desviación estándar aunque no es demasiado.

Tabla 17. Distancias y ángulos del centro C4 de los sistemas MIC1.

Sistema	Distancia (Å)	Angulo (°)			
		A1	A2	A3	A4
Cu-MIC1	1,988±0,062	100,27±3,66	95,59±3,32	97,59±3,88	95,89±3,66
Ni-MIC1	1,914±0,052	89,93±2,23	90,25±2,26	90,18±2,19	89,80±2,12
Zn-MIC1	2,088±0,060	84,65±3,72	81,81±3,72	81,98±3,72	79,91±3,81

Tabla 18. Ángulos diedros del centro C4 de los sistemas MIC1.

Sistema	Diedros (°)	
	D1	D2
Cu-MIC1	141,06±5,30	140,23±5,23
Ni-MIC1	176,97±2,20	176,97±2,20
Zn-MIC1	139,28±4,50	141,08±4,93

Las diferencias de los centros C4 entre los sistemas 4His-ΔC* y MIC1 son mínimas, apenas se aprecian diferencias significativas, manteniendo una desviación estándar baja. Estos resultados concuerdan con la estructura geométrica que presentan los centros C4 en los sistemas 4His-ΔC* y MIC1.

6.1.2.2. Centro Metálico C3

Aquí el centro C3 solo tiene un calcio en donde se enlazan los tres glutamatos y los tres aspartatos.

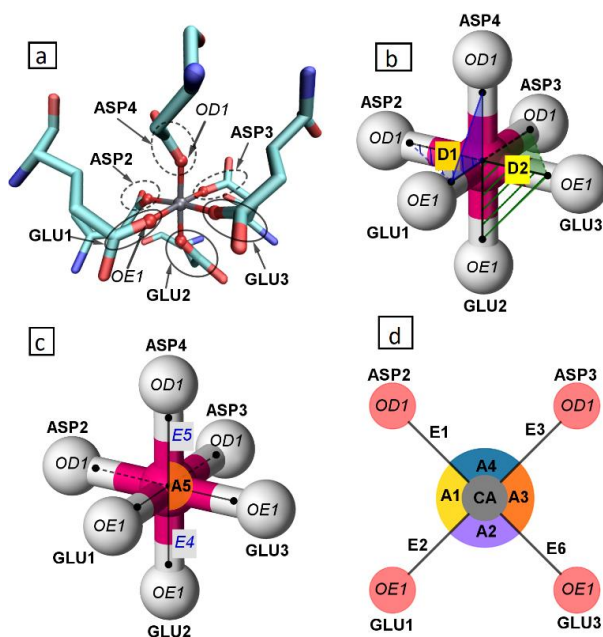


Imagen 36. (a) Centro metálico C3 se forma un octaedro. (b) Los diedros formados entre el calcio y los residuos. (c) y (d) ángulos y distancias formados entre los residuos y el calcio.

En todos los metales el centro presenta una estructura octaédrica. Los resultados (Tabla 19, Tabla 20 y Tabla 21) de estos centros metálicos no muestran diferencias apreciables entre ellos tanto en distancias de enlace como en ángulos, y siempre manteniendo unas desviación típica bastante moderada.

Tabla 19. Distancias del centro C3 de los sistemas MIC1.

Sistema	Distancias (Å)					
	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Cu-MIC1	1,714±0,142	1,754±0,142	1,712±0,132	1,715±0,137	1,786±0,143	1,747±0,143
Ni-MIC1	1,698±0,136	1,735±0,134	1,703±0,131	1,704±0,131	1,752±0,130	1,681±0,126
Zn-MIC1	1,680±0,141	1,754±0,134	1,696±0,131	1,731±0,136	1,774±0,138	1,721±0,134

Tabla 20. Ángulos del centro C3 de los sistemas MIC1.

Sistema	Ángulos (°)				
	A1	A2	A3	A4	A5
Cu-MIC1	88,37±4,14	89,87±3,67	89,13±3,49	92,55±3,94	175,45±2,32
Ni-MIC1	89,02±4,20	89,98±3,41	87,88±3,44	93,04±4,06	174,69±2,64
Zn-MIC1	88,00±4,12	90,72±3,32	88,39±3,26	92,80±3,84	175,25±2,42

Tabla 21. Ángulos diedros del centro C3 de los sistemas MIC1.

Sistema	Diedros (°)	
	D1	D2
Cu-MIC1	93,63±3,84	86,86±3,41
Ni-MIC1	93,82±3,94	89,35±4,75
Zn-MIC1	94,58±3,49	86,67±3,54

Estos centros metálicos no muestran diferencias apreciables entre ellos tanto en distancias de enlace como en ángulos, y siempre manteniendo unas desviación típica bastante moderada. La principal diferencia a recalcar está en la diferencia de centro que presentan los sistemas 4His- ΔC^* con los de MIC1.

6.1.2.3. Centro Metálico C2

El centro metálico C2 cuenta con dos variantes C2-A (4His) y C2-B (Ca), igual que en el anterior sistema.

El centro C2-A (4His) está formado por cuatro histidinas enlazadas a un metal divalente.

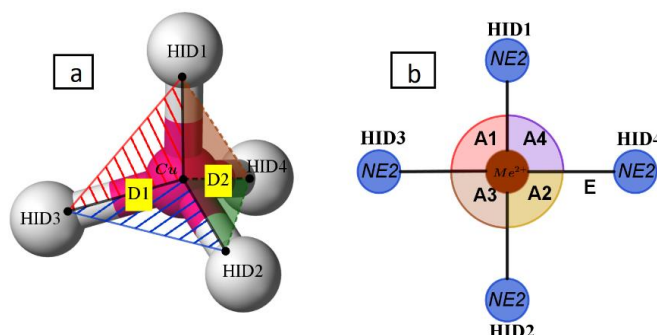


Imagen 37. (a) Estructura del C4. Se indican los ángulos diedros. (b) Se indican los ángulos formados por el metal y los nitrógenos.

Este centro en el sistema con cobre presenta una estructura tetraédrica achatada, con níquel tiene una estructura cuadrada y con zinc un tetraedro distorsionado. Las distancias apenas varían entre ellas, la diferencia más alta que hay es entre el sistema con níquel y el zinc pero nada significativo, con una desviación típica bastante baja. Los ángulos también se muestran bastante estables con una desviación estándar baja, por último los diedros de los sistemas Cu-MIC1 y Zn-MIC1 muestran una desviación estándar un poco alta respecto al del Ni-MIC1.

Tabla 22. Ángulos y distancias del centro C2-A (4His) de los sistemas MIC1.

Sistema	Distancia (Å)	Angulo (°)			
		A1	A2	A3	A4
Cu-MIC1	2,026±0,064	91,76±2,80	94,04±3,24	90,18±3,58	91,12±2,83
Ni-MIC1	1,926±0,054	91,56±2,03	91,45±2,38	89,82±2,22	90,39±2,09
Zn-MIC1	2,133±0,076	95,47±3,61	102,12±3,88	86,24±3,48	91,55±3,89

Tabla 23. Ángulos diedros del centro C2-A (4His) de los sistemas MIC1.

Sistema	Diedros (°)	
	D1	D2
Cu-MIC1	156,41±5,91	156,89±5,98
Ni-MIC1	165,33±3,46	165,37±3,46
Zn-MIC1	140,27±7,72	141,86±8,90

La diferencia entre los centros C2-A (4His) de los sistemas 4His-ΔC* y MIC1 está en los ángulos A1 y A4 de los sistemas Zn-MIC1 y Zn-4His-ΔC* (Tabla 22 y Tabla 8, respectivamente) en donde hay una

diferencia de 8° a favor del Zn-4His- ΔC^* . También se ha observado diferencias entre los ángulos diedros D1 y D2 (Tabla 9 y Tabla 23) de los sistemas con zinc, en donde Zn-MIC1 presenta un ángulo mucha más acentuado que el del sistema Zn-4His- ΔC^* , tienen un diferencia de 25°.

El segundo tipo (C2-B) está formado por un calcio enlazado a un aspartato y una glutamina.

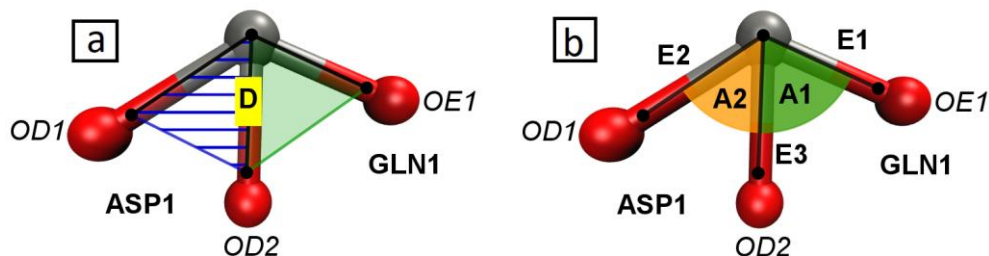


Imagen 38. (a) Ángulos diedros del centro C2-B. (b) ángulos y distancias del centro C2-B.

Este centro presenta una estructura en forma de T distorsionada con todos los diferentes metales divalentes. La desviación estándar tan alta de los diedros es debido a que la glutamina tiene movimientos más bruscos que el aspartato ya que este centro está posicionado en la parte exterior de la ferritina. La geometría estructural del sistema se muestra bastante estable en lo que respecta a distancias y ángulos.

Tabla 24. Distancias, ángulos y diedros del centro C2-B (Ca) de los sistemas MIC1.

Sistema	Distancia (Å)			Ángulos (°)		Diedros (°)
	E1	E2	E3	A1	A2	
Cu-MIC1	2,328±0,104	2,414±0,057	2,331±0,107	72,18±3,96	53,98±1,35	164,51±12,13
Ni-MIC1	2,330±0,103	2,415±0,057	2,330±0,105	72,60±4,21	53,94±1,35	161,83±13,69
Zn-MIC1	2,327±0,105	2,414±0,057	2,330±0,107	72,01±3,89	53,97±1,35	164,80±11,56

Como se puede ver en la Imagen 39 se ha medido la distancia que hay entre cada metal del par de centros C2-A (4His) y la distancia entre calcio que hay en los dos centros C2-B (Ca).

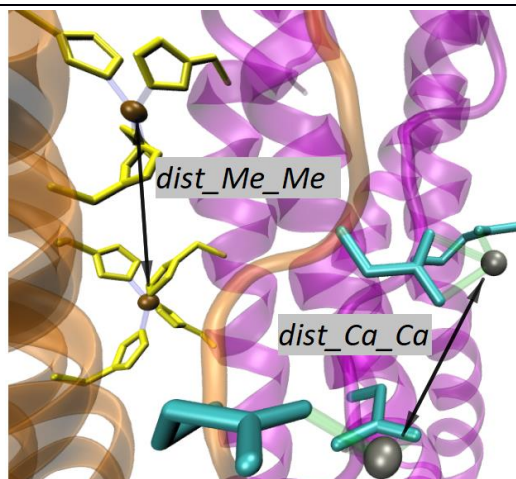


Imagen 39. La distancia entre metales del C2-A ($dist_Me_Me$) y la distancia entre calcio del C2-B ($dist_Ca_Ca$).

Se aprecia una diferencia bastante grande de distancias en los diferentes sistemas del centro C2-A (4His), con variaciones de hasta 2 Å, además presentan una desviación típica alta (concretamente los sistemas Cu-MIC1 y Ni-MIC1 tienen más de 1Å). El único centro que tiene una distancia estable es del sistema Zn-MIC1. En los centros C2-N (Ca) se aprecia que el sistema Zn-MIC1 tiene la mayor distancia y el sistema Cu-MIC1 la que menos (variaciones de 0,3Å respecto al Cu-MIC1), en todos los sistemas las distancias C2-B (Ca) se mantienen con una desviación típica parecida.

Tabla 25. Distancias entre metales de los centros C2 de los sistemas MIC1.

Sistema	C2-A	C2-B
	Dist_Me-Me (Å)	Dista Ca-Ca (Å)
MIC1-Cu	14,899±1,362	8,786±0,741
MIC1-Ni	13,341±1,086	9,075±0,760
MIC1-Zn	12,948±0,561	9,158±0,708

La diferencia de distancias entre los centros C2-A (4His) de los sistemas 4His-ΔC* y MIC1 (Tabla 11 y Tabla 25) son muy notorias. Las distancias en los sistemas 4His-ΔC* se mantienen alrededor de los 11Å con una desviación típica de 0,3Å, mientras las distancias del sistema MIC1 varían notablemente, hasta 2Å como máximo). Esto se debe en parte por la diferencia de las estructuras que presentan los centros C2-A (4His) del sistema 4His-ΔC* ante los del sistema MIC1. Otro factor que influye en estas distancias es la coordinación de las moléculas de agua con el ion metálico, esta característica se verá más adelante en el siguiente apartado.

En los centros C2-B (Ca) se puede ver que han variado un poco, especialmente los sistemas Ni-MIC1 y Zn-MIC1, donde las distancias varían hasta un máximo de 0,3Å. Esta variación se debe a que este centro se encuentra en una zona externa de la proteína donde hay una mayor exposición al medio solvente.

6.1.2.4. Centro Metálico CM

Este centro metálico, respecto al del anterior sistema, está formado solo por un ion metálico. Este metal está unido a dos glutamatos y una histidina.

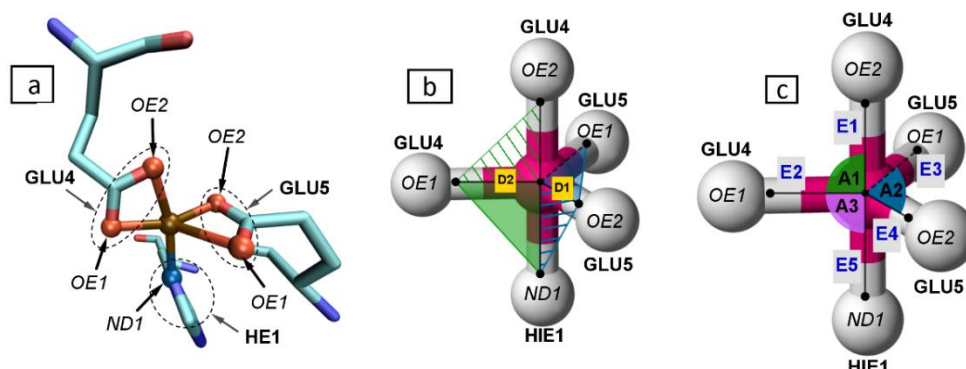


Imagen 40. (a) Centro metálico CM. (b) Representación del CM. ángulos diedros formados por el ion metálico y los ligandos. (c) ángulos y distancias entre el metal y los residuos.

Este centro en presencia del cobre y níquel presenta una estructura más cercana a una bipirámide trigonal y con el zinc a una piramidal cuadrada.

Se pueden ver que las distancias de enlace (Tabla 26) en los sistemas presentan pocas variaciones con una desviación estándar muy baja. En donde hay más variación es en los enlaces E3 y E4, esto es debido a la diferencia de su geometría de coordinación ya que no son estructuras (bipirámide trigonal y piramidal cuadrada) perfectas sino aproximaciones. Lo mismo se podría decir de los ángulos de enlace y de los ángulos diedros de los sistemas Cu-MIC1 y Ni-MIC1, algunos presentan variaciones un poco altas pero con una desviación estándar muy baja. El sistema que si presenta una variación alta es el sistema Zn-MIC1 debido a que su estructura geométrica es diferente que las otras.

Tabla 26. Distancias del centro CM del sistema MIC1.

Sistema	Distancias (Å)				
	E1	E2	E3	E4	E5
Cu-MIC1	1,960±0,052	1,957±0,053	2,229±0,090	2,229±0,090	1,963±0,060
Ni-MIC1	1,883±0,042	1,882±0,041	1,780±0,043	2,706±0,088	1,883±0,048
Zn-MIC1	2,035±0,078	1,926±0,066	1,919±0,060	2,058±0,080	1,985±0,064

Tabla 27. Ángulos y diedros del centro CM del sistema MIC1.

Sistema	Ángulos (°)			Diedros (°)	
	A1	A2	A3	D1	D2
Cu-MIC1	67,20±1,53	63,53±2,08	94,98±2,70	103,88±4,35	170,82±5,72
Ni-MIC1	70,04±1,36	53,85±2,00	98,72±2,16	102,05±3,81	172,71±4,20
Zn-MIC1	66,22±1,85	66,01±1,90	121,43±4,53	122,76±5,15	95,88±4,82

Los centros metálicos CM de los sistemas MIC1 muestran un comportamiento más estable que los centros CM de los sistemas 4His-ΔC*, esto es debido a la diferencia de iones metálicos y de residuos enlazados que tienen cada uno. El centro CM de los sistema MIC1 tiene una geometría de coordinación más estable porque solo tiene un ion metálico que enlazado a los ligandos, por lo que tiene un estructura más rígida que los centros CM de los sistemas 4His-ΔC*. Este factor también será importante para la estabilización de los iones metálicos por aguas de coordinación, de esto se hablara en el siguiente apartado.

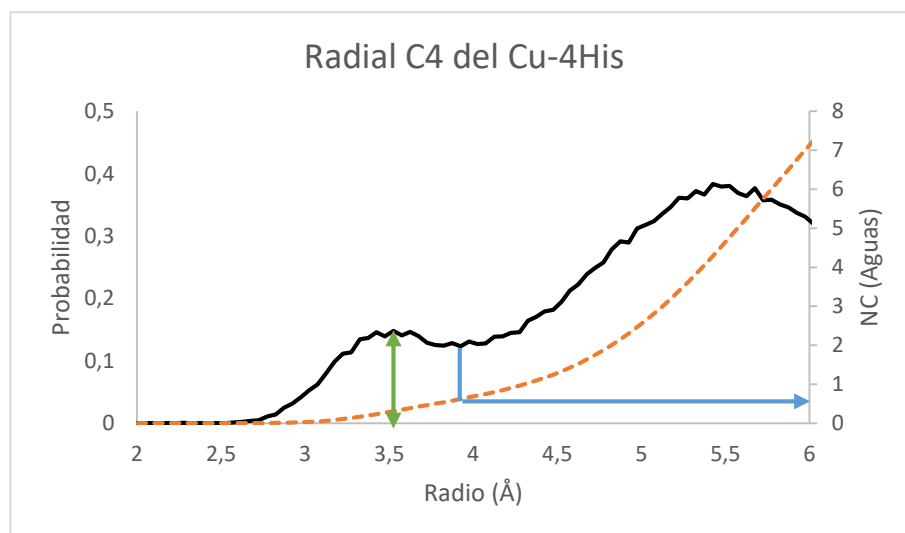
6.2. Función de Distribución Radial

Con la función de distribución radial (RDF) se han hallado el número de aguas de la primera esfera de solvatación de los diferentes metales divalentes a parte de los ligandos ya existentes con las cadenas laterales de los aminoácidos en los que está coordinado. Se analizaron juntamente los metales de un mismo tipo de centro metálico.

6.2.1. Sistema 4His- ΔC^*

6.2.1.1. Centro Metálico C4

Se han cogido los 6 iones metálicos de transición que forman los diferentes centros C4 de todo el sistema. Las aguas de coordinación resultantes corresponden al número de aguas que podemos encontrar (flecha azul) a una distancia de máxima probabilidad (flecha verde) para cada centro metálico.



Gráfica 4. Distribución Radial de los centros C4 del sistema Cu-4His- ΔC^* .

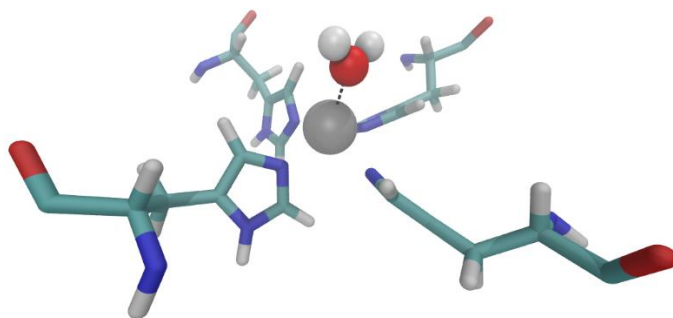
En la Gráfica 4 se puede ver que el centro C4 del sistema Cu-4His- ΔC^* en la primera esfera de solvatación se encuentran 0,6 aguas a una distancia de 3,5 Å de máxima probabilidad.

Se puede ver en la Tabla 28 que los centros metálicos del sistema Cu-4His- ΔC^* es el que atrae a menos aguas a una distancia mayor (3,48 Å) que el resto de sistemas, es por esto que presenta una estructura tetraédrica ya que la molécula de agua no llega a coordinarse perfectamente.

Tabla 28. Resultado de la RDF de los centros C4 del 4His- ΔC^*

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-4His- ΔC^*	3,48	0,6
Ni-4His ΔC^*	2,93	1,2
Zn-4His- ΔC^*	2,18	1,0

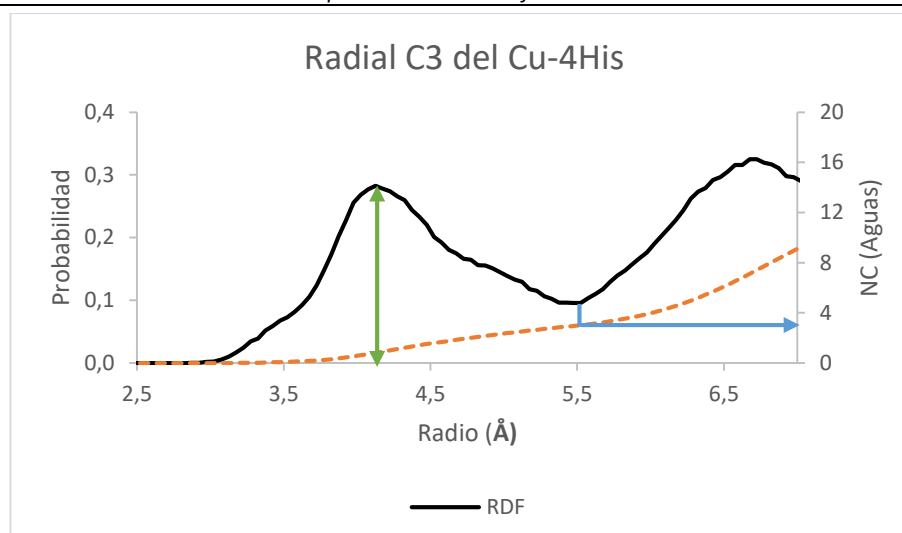
Los sistemas Ni-4His- ΔC^* y Zn-4His- ΔC^* se coordinan con una molécula de agua a una distancia de 2,93Å y 2,18 Å, respectivamente. Las estructuras de estos sistemas, el níquel tiene una estructura plana y el zinc presenta una estructura tetraédrica distorsionada (balancín), es debido a la molécula de agua de coordinación adicional y a la distancia que está la molécula de agua (a una menor distancia esta desplazara a los residuos). De los dos, el níquel es el que atrae a más aguas aunque a una distancia mayor (>0,7Å de diferencia) que el zinc con un numero parecido de aguas. Por otro lado, el zinc es el que se coordina con el agua a una distancia menor, como se puede ver en la Imagen 41.

**Imagen 41. Agua coordinada con el centro C4 del sistema Zn-4His- ΔC^* .**

También se ha de comentar que el centro C4 está en una posición interna en la superestructura de la ferritina por lo que dificulta el acceso del medio solvente.

6.2.1.2. Centro C3

Este tipo de centro metálico tiene un total de 16 iones de calcio debido a que hay dos calcios por cada centro. Se ha hecho la distribución radial para todos los 16 iones del calcio de cada sistema.



Gráfica 5. Distribución Radial de los centros C3 del sistema Cu-4His-ΔC*

En la Gráfica 5 se puede ver que la distribución radial de los centros C3 del sistema Cu-4His-ΔC* en la primera solvatación encontramos tres moléculas de aguas a una distancia de 4,2 Å de máxima probabilidad. Todos los centros de los tres sistemas dan una distribución radial parecida.

El número de coordinación más alto corresponde al sistema con zinc, siendo éste el que atrae a más aguas. Aunque en general, tenemos alrededor de unas 3 aguas de coordinación ligadas a los iones metálicos de Ca^{2+} a una distancia parecida (alrededor de 4 Å).

Tabla 29. Resultado de la RDF de los centros C3 del 4His-ΔC*

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-4His-ΔC*	4,18	3,0
Ni-4His-ΔC*	4,13	2,5
Zn-4His-ΔC*	4,08	3,3

Los centros metálicos C3 de los diferentes sistemas presentan la misma estructura por lo que es razonable que tengan un número de coordinación parecido, recordemos que cada calcio tiene una estructura trigonal plana por lo que favorece la coordinación con las aguas.

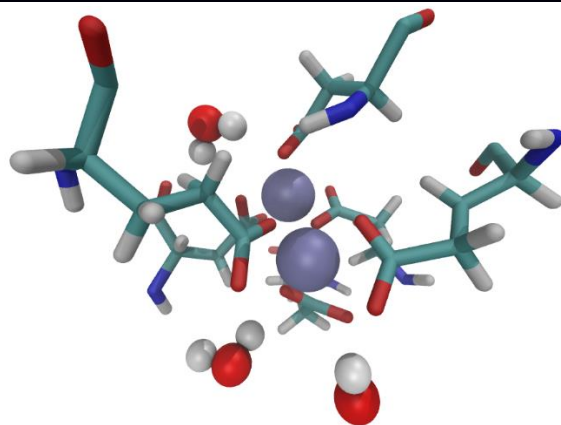
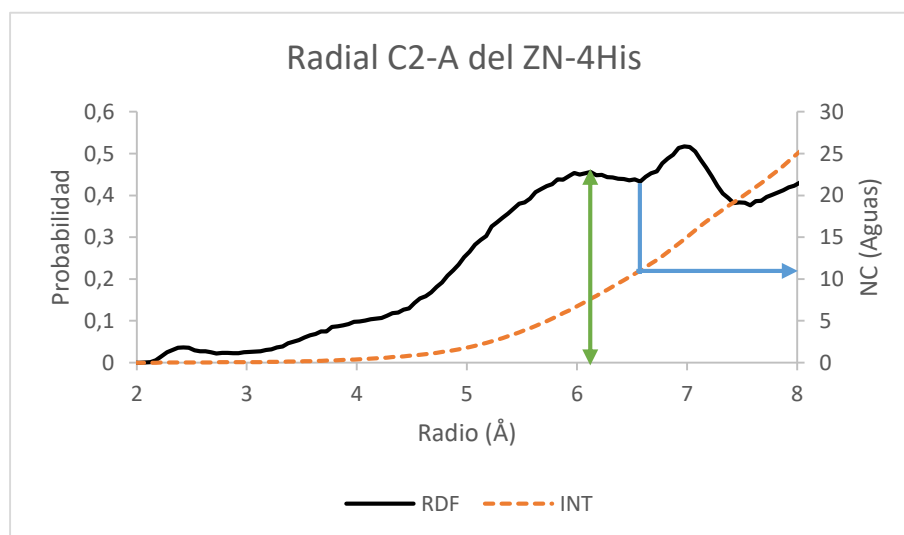


Imagen 42. Tres aguas de solvatación en el centro C3 del sistema Zn-4His-ΔC*.

Este centro también se encuentra en una posición desfavorable en la superestructura de la ferritina por lo que dificulta el acceso del medio solvente. También el número de enlaces que tiene cada calcio (6 enlaces con los aminoácidos) hace que sea más complicado coordinar moléculas de agua, las cuales se disponen a distancias de hasta 4 Å, la cual no permite considerarse como aguas estrictamente de coordinación aunque si de solvatación.

6.2.1.3. Centro Metálico C2

Como se ha mencionado antes, este centro metálico tiene dos tipos. La primera C2-A (4 Histidinas) tiene un total de 24 iones metálicos. Se han cogido los metales de transición que forman el centro para hacer la distribución radial de estos, al igual que en el centro C4.



Gráfica 6. Distribución Radial de los centros C2A (4His) del sistema Zn-4His-ΔC*.

El sistema Zn-4His-ΔC* tiene una distribución radial diferente al resto, en la Gráfica 6 se puede ver que hay un primer mínimo (en los 2,8 Å aprox.) que corresponde a la primera esfera de solvatación donde hay una probabilidad muy baja de encontrar un agua de coordinación, da casi cero. Por esta razón se

buscó el siguiente mínimo, la segunda esfera de solvatación, para encontrar las aguas que atrae el centro metálico. Al aumentar la distancia máxima probabilidad (flecha verde en la Gráfica 6) también aumentó el número de aguas de solvatación.

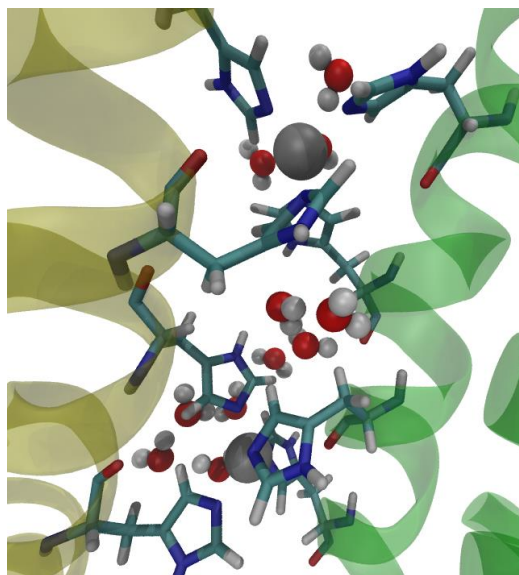


Imagen 43. Aguas de solvatación en el centro metálico C2-A (4His) del sistema Zn-4His- ΔC^* .

En la Imagen 43 se puede apreciar las moléculas de aguas más cercanas al par del centro metálico C2-A del sistema Zn-4His- ΔC^* . También se observa que algunas aguas están más cerca del centro que otras e incluso algunas están en medio de ambas.

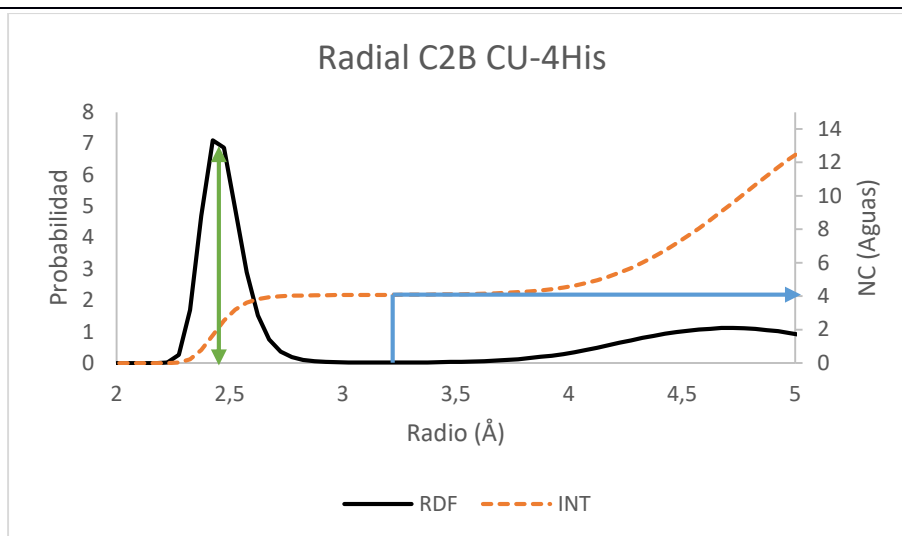
Tabla 30. Resultados de la RDF de los centros C2A (4His) del 4His- ΔC^*

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-4His- ΔC^*	5,83	6,4
Ni-4His- ΔC^*	5,88	5,4
Zn-4His- ΔC^*	6,13	11,0

Se observa que el zinc tiene un mayor número de aguas de solvatación que el resto. Atrae a un total de 11 aguas. En general este centro metálico está más expuesto al solvente que no acaso los anteriores, dando lugar a un mayor número de aguas de solvatación. Por otra parte, las distancias más probables son bastantes altas., entre 5,8 y 6,1 Å, lo que nos indica que estos centros metálicos no tienen muy buen acceso al medio solvente.

Todos los centros metálicos C2-A (4His) de los diferentes sistemas presentan una estructura tetraédrica achatada porque no tienen aguas de coordinación.

El centro metálico C2-B (Ca) está formado por un solo calcio por lo que tendríamos un total de 24 iones. Se ha hecho la distribución radial de todos ellos para cada sistema.



Gráfica 7. Distribución Radial de los centros C2-B (Ca) del sistema Cu-4His-ΔC*.

La gráfica de distribución radial de los centros C2-B (Gráfica 7) muestra un comportamiento correcto, donde en la primera solvatación se espera un gran máximo y mínimo seguidamente de otros más pequeños a medida que la distancia va aumentando. En la primera esfera de solvatación se puede ver que hay una alta probabilidad de encontrar aguas de coordinación.

Tabla 31. Resultados de la RDF de los centros C2-B (Ca) del 4His-ΔC*

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-4His-ΔC*	2,43	4,0
Ni-4His-ΔC*	2,43	4,1
Zn-4His-ΔC*	2,43	4,1

No se observan diferencias apreciables entre los tres sistemas simulados. Todos ellos se coordinan con un total de 4 aguas complementando así el resto de ligando de coordinación con los aminoácidos de la proteína.

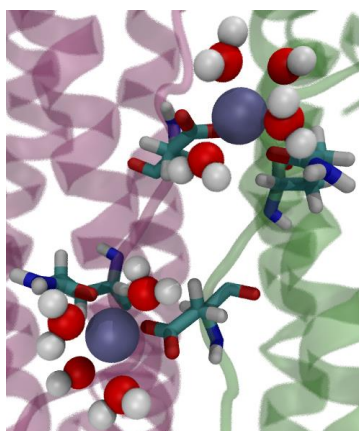
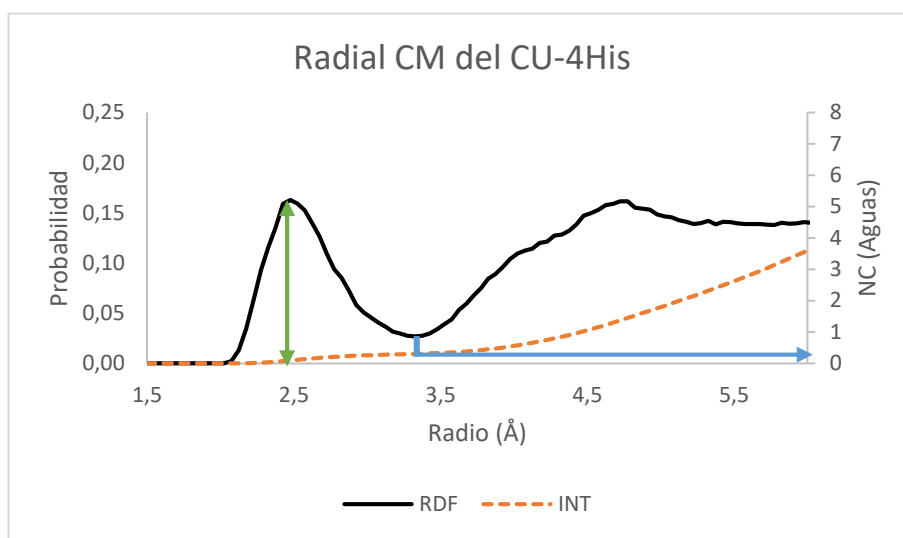


Imagen 44. Aguas de coordinación del centro C2-B (Ca) del sistema Cu-4His-ΔC*.

Se puede ver en la Imagen 44 que las cuatro aguas se coordinan con el ion calcio. La coordinación con las aguas es favorecida por: la estructura que tiene el centro metálico C2-B (forma de T), la posición en donde se ubica éste centro (en la parte exterior de la ferritina) donde está más expuesto al medio solvente y al tener pocos enlaces con los ligandos (tres en total). La coordinación total de los iones de calcio (entre aguas y ligandos) en el centro C2-B (Ca) es de 7.

6.2.1.4. Centro Metálico CM

Este centro está formado por dos metales de transición. Por lo tanto habrá un total de 48 metales a analizar. Se ha hecho la distribución radial de todos los iones metálicos para cada sistema.



Gráfica 8. Distribución Radial del centro CM del sistema Cu-4His-ΔC*.

En la Gráfica 8 se puede ver que la primera solvatación del centro CM con cobre se encuentran 0,3 aguas a una distancia de 2,5Å de máxima probabilidad por lo que para encontrar la primera molécula de agua se ha de buscar el siguiente mínimo de la función, que es la siguiente solvatación. El sistema con cobre presentaba una estructura tetraédrica para ambos metales por lo que nos indica que no presenta moléculas de agua de coordinación.

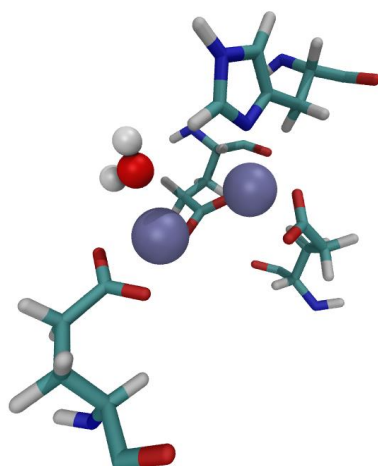


Imagen 45. Agua coordinada al centro CM del sistema Zn-4His-ΔC*

Diferente comportamiento presenta los sistemas con Ni y Zn, los cuales se obtienen una molécula de agua de coordinación. En la Imagen 45 se observa que el sistema con zinc se coordina con una molécula de agua, esta coordinación se produce con el ion metálico que esta enlazado a los dos glutamatos, es por esto que presenta una estructura de tetraedro distorsionado (balancín) y no el otro, el que esta enlazado a la histidina, que presenta una estructura tetraédrica. Esto también sucede con el sistema Ni-4His-ΔC*.

Tabla 32. Resultados de la RDF de los centros CM del 4His-ΔC*

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-4His-ΔC*	2,53	0,3
Ni-4His-ΔC*	2,28	1,0
Zn-4His-ΔC*	2,23	1,1

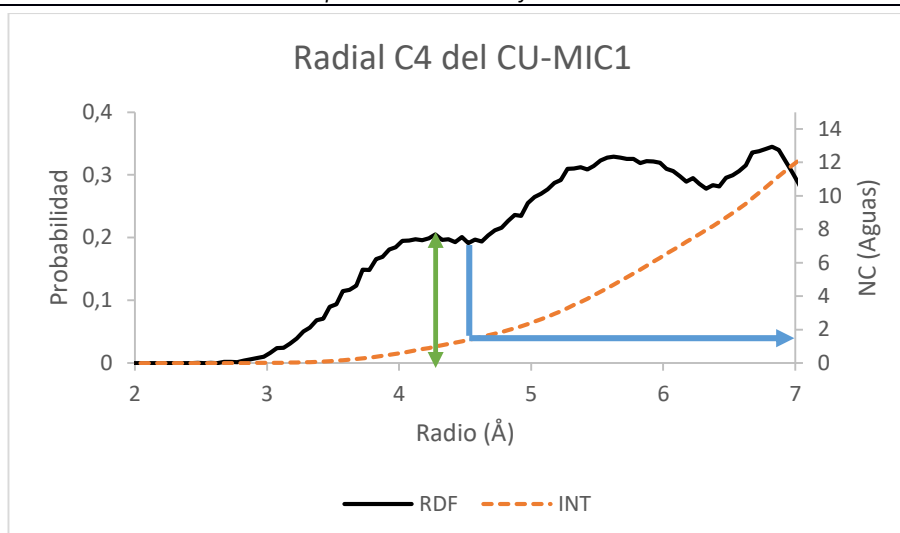
El sistema con cobre es el que presenta una menor coordinación (0,3 moléculas de agua) que el resto, en los cuales se encuentra una molécula de agua de coordinación en el centro metálico a una distancia de 2,28 y 2,23Å en los sistemas de níquel y cobre, respectivamente.

6.2.2. Sistema MIC1

De la misma manera que en el sistema anterior, se ha obtenido la función de distribución radial de cada centro metálico, siempre considerando la totalidad de los metales de un mismo tipo de centro de cada sistema.

6.2.2.1. Centro Metálico C4

Al igual que en el sistema 4His-ΔC* se han cogido los 6 iones metálicos que forman los centros C4 de cada sistema.



Gráfica 9. Distribución Radial del centro C4 del sistema Cu-MIC1.

Se puede ver en la Gráfica 9 que el centro C4 del sistema Cu-MIC1 tiene 1,4 moléculas de aguas a una distancia de 4,3Å. Este centro metálico atrae a más aguas que el centro C4 del sistema Cu-4His-ΔC* (Gráfica 4) pero con una distancia de probabilidad mayor (distancia del Cu-4His-ΔC* es de 3,48Å), lo cual muestra la mayor inaccesibilidad del solvente en el sistema MIC1. Por otro lado el centro C4 del sistema Ni-MIC1 atrae a más aguas que el sistema Ni-4His-ΔC* (1,5 frente a 1,2 aguas. Tabla 28). Por ultimo en los sistemas con zinc (Zn-4His-ΔC* y Zn-MIC1) los resultados son idénticos, donde una molécula de agua se coordina a una distancia de 2,18 Å.

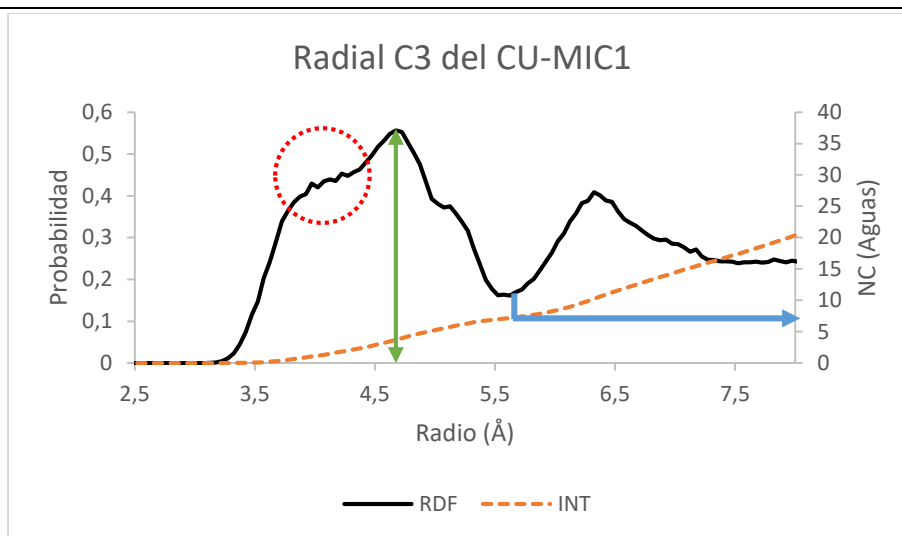
Tabla 33. Resultados de la RDF de los centros C4 del MIC1

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-MIC1	4,33	1,4
Ni-MIC1	2,93	1,5
Zn-MIC1	2,18	1,0

En la Tabla 33 el sistema con níquel es el que atrae más moléculas de agua (1,5 aguas coordinadas a una distancia de 2,9Å) seguido del cobre con 1,4 moléculas de agua (con una distancia de 4,3Å, la más alta de todas) y por último el zinc con una molécula de agua. Podemos concluir que los únicos sistemas que presentan aguas de coordinación en el centro C4 son los formados con níquel y zinc. Las estructuras de estos sistemas son iguales a las del 4His-ΔC* porque con el níquel y zinc hay coordinación con una molécula de agua y con el cobre solo hay solvatación.

6.2.2.2. Centro Metálico C3

A diferencia de los centros C3 del sistema 4His-ΔC*, en donde el centro C3 tenía dos calcio, este tipo de centro tan solo cuenta con un calcio por lo que tendremos un total de 8 iones para analizar.



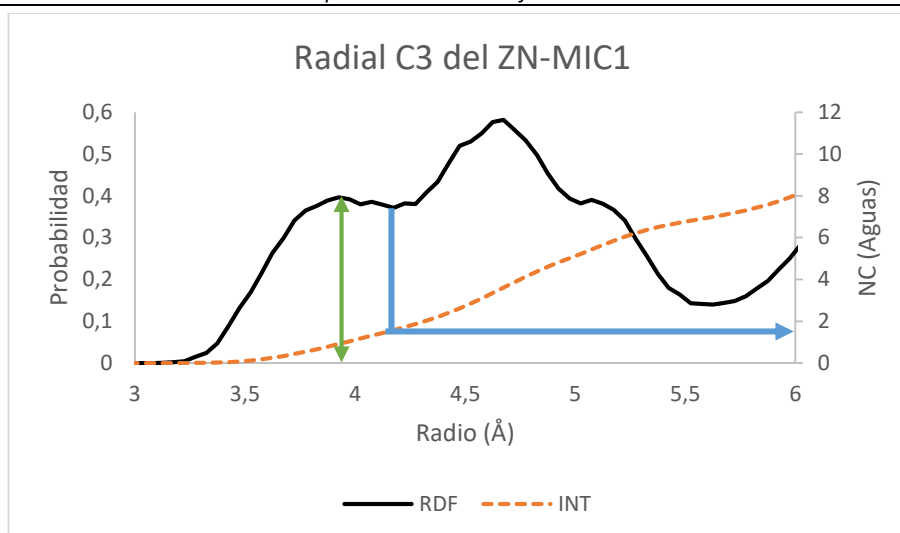
Gráfica 10. Distribución Radial del centro C3 del sistema Cu-MIC1.

La función de distribución radial del centro C3 del sistema Cu-MIC1 (Gráfica 10) tiene un comportamiento diferente al resto de sistemas. La primera esfera de solvatación (círculo rojo) está demasiado cerca a la segunda por lo que no se pueden diferenciar. Es por esto que para el sistema Cu-MIC1 se cogió la distancia de 4,7 Å de máxima de probabilidad dando como resultado siete moléculas de aguas. El sistema con níquel es el atrae más aguas, dos moléculas, y el sistema con zinc es el que menos (1,6 moléculas de aguas). Los dos sistemas (níquel y zinc) tienen una distancia parecida de probabilidad máxima.

Tabla 34. Resultado de la RDF de los centros C3 del MIC1

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-MIC1	4,73	7,2
Ni-MIC1	3,93	2,1
Zn-MIC1	3,98	1,6

En los sistemas Ni-MIC1 y Zn-MIC1 se puede apreciar mejor la primera solvatación (Gráfica 11) por lo que da un número de aguas menor que el sistema Cu-MIC1.



Gráfica 11. Distribución Radial del centro C3 del sistema Zn-MIC1.

Los tres sistemas tienen una estructura octaédrica lo que dificulta la posible coordinación con las moléculas de agua. Debido a la distancia de máxima probabilidad en que encontramos las aguas, estos sistemas solo presentan solvatación con las moléculas de agua, siendo el sistema con cobre el que tiene más aguas alrededor del calcio (Imagen 46). Tal como puede verse en la imagen las aguas de solvatación están principalmente alrededor de los grupos polares de los ligandos que no acaso solvatando al propio centro metálico, lo que explicaría la mayor distancia observada.

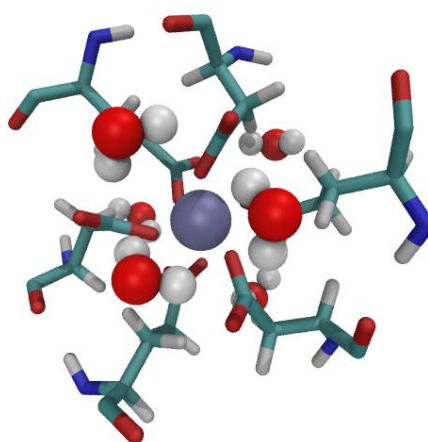
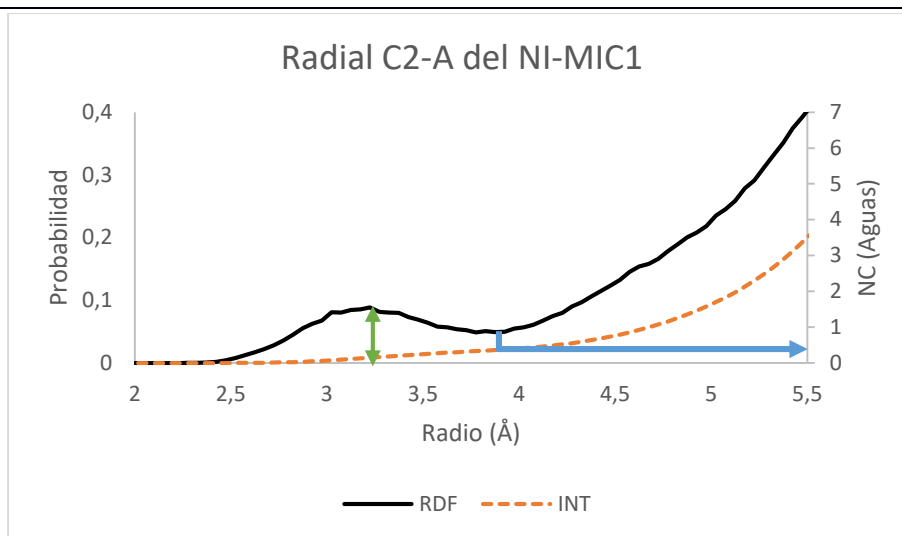


Imagen 46. Aguas de solvatación del centro C3 del sistema Cu-MIC1.

6.2.2.3. Centro Metálico C2

Para los centros C2 (C2-A y C2-B) se ha hecho la distribución radial para cada tipo. El centro C2-A (4His) tiene un total de 24 iones metálicos.



Gráfica 12. Distribución Radial del centro C2-A (4His) del sistema Ni-MIC1.

En la gráfica se puede ver que el centro C2-A (4Histidinas) del sistema Ni-MIC1 tiene 0,3 aguas de coordinación a una distancia de 3,23Å. Los sistemas con cobre y zinc coordinan más aguas, siendo el zinc el que más (Tabla 35) a una distancia menor. Observando estos resultados podemos decir que el sistema con zinc presenta un agua perfectamente coordinada con el metal, mientras que el cobre presenta una coordinación débil con un agua y que el sistema con níquel la presencia de agua es mucho menor y se puede atribuir a solvatación más que no acaso a un agua de coordinación.

Los centros C2-A del sistema MIC1 atraen menos moléculas de agua a diferencia de los centros C2-A del sistema 4His-ΔC* (ver Tabla 30), esto es debido a que las aguas atraídas por el sistema MIC1 son principalmente aguas de coordinación por el contrario las moléculas de agua atraídas por el sistema 4His-ΔC* son aguas de solvatación.

Tabla 35. Resultados de la RDF de los centros C2A (4His) del MIC1

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-MIC1	2,73	0,7
Ni-MIC1	3,23	0,3
Zn-MIC1	2,43	0,9

La coordinación del agua, de los sistemas MIC1, afecta a la estructura de cada centro metálico. Es por esto que el cobre presenta una estructura tetraédrica, al no tener aguas de coordinación, el níquel tiene una estructura cuadrada y el zinc una estructura de balancín. Esto supone una diferencia notable respecto a los centros C2-A (4His) de los sistemas 4His-ΔC*, donde todos los centros presentan una estructura tetraédrica.

En la Imagen 47 se puede ver una molécula de agua coordinada en cada centro C2-A del sistema Zn-MIC1. Hay pocas moléculas de agua a diferencia del centro C2-A del sistema 4His- ΔC^*

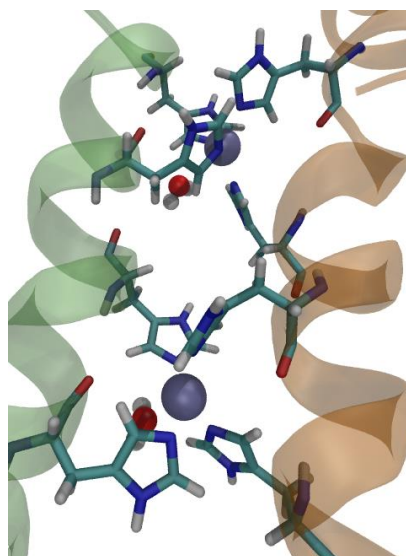
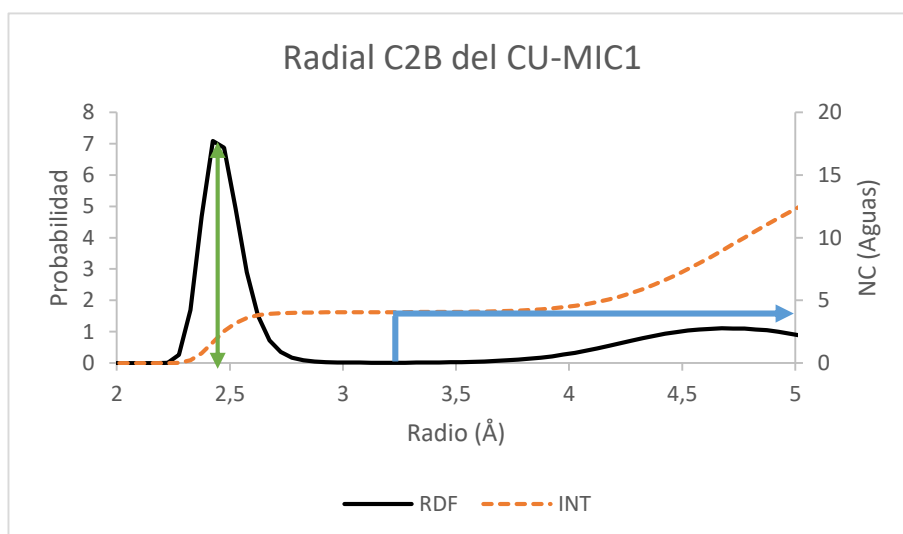


Imagen 47. Aguas coordinadas al centro C2-A (4His) del sistema Zn-MIC1.

Los centros C2-B (Ca) del sistema MIC1 son un total de 24. Por lo que se harán la distribución radial de los 24 iones de calcio.



Gráfica 13. Distribución Radial del centro C2-B (Ca) del sistema Cu-MIC1.

En la gráfica se puede ver que la distribución radial tiene un máximo muy grande (flecha verde) seguido de un mínimo bastante notable (flecha azul).

La distribución radial de este centro tiene un comportamiento idéntico al de los sistemas 4His- ΔC^* (ver Tabla 31). Se parecía una coordinación de 4 moléculas de aguas a una distancia de probabilidad máxima de 2,4 Å.

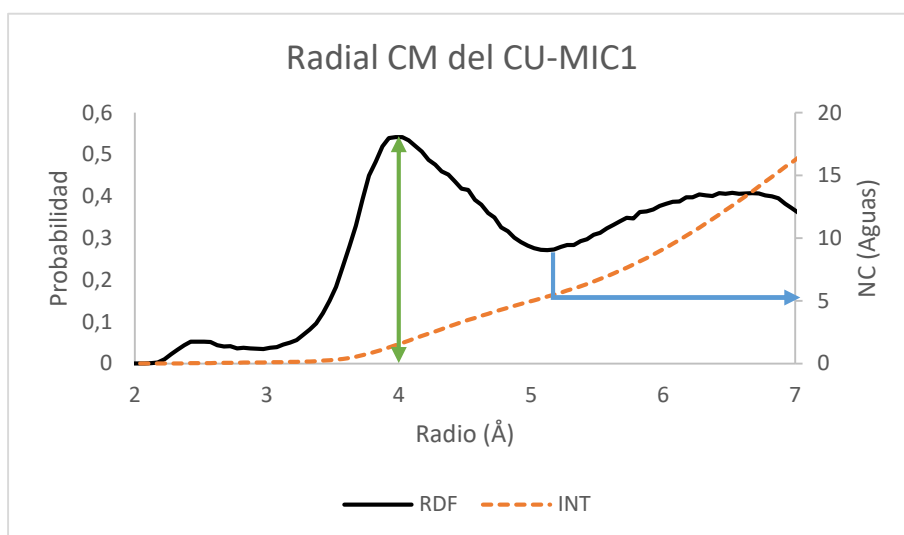
Tabla 36. Resultados de la RDF de los centros C2B (Ca) del MIC1

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-MIC1	2,43	4,1
Ni-MIC1	2,43	4,1
Zn-MIC1	2,43	4,1

El motivo de que sean parecidos los centros metálicos de los sistemas 4His- ΔC^* y MIC1 es porque tienen la misma estructura y una posición favorable al medio solvente.

6.2.2.4. Centro Metálico CM

El centro CM tiene un total del 24 iones metálicos. Se hizo la función radial para todos los centros metálicos de cada sistema.

**Gráfica 14. Distribución Radial del centro CM del sistema Cu-MIC1.**

La función de distribución radial del sistema Cu-MIC1 (Gráfica 14) en la primera solvatación, primer mínimo, que da cero aguas de coordinación. Es por esto que se buscó la segunda solvatación, segundo mínimo, para encontrar las moléculas de aguas.

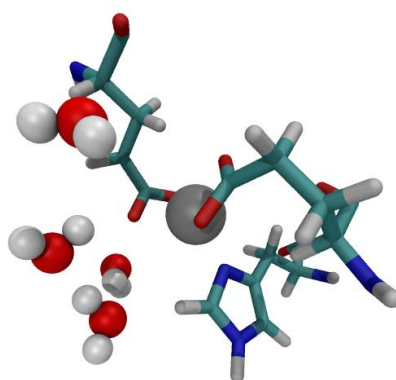
El sistema con zinc atrae más moléculas que el resto de sistemas, 9 moléculas de agua, pero a una mayor distancia de probabilidad (4,53Å). Esto sucede porque su estructura, piramidal cuadrada aproximadamente, impide la coordinación con las moléculas de agua por lo que la distancia que tiene serán de aguas de solvatación.

Los otros sistemas atraen a un número de aguas parecidas a una distancia de 4Å, esto se debe a que ambos sistemas presentan una estructura parecida (bipirámide trigonal).

Tabla 37. Resultados de la RDF de los centros CM del MIC1

Sistema	Distancia (Å)	Nº Aguas
Cu-MIC1	4,03	5,3
Ni-MIC1	3,98	4,8
Zn-MIC1	4,53	9,0

En la Imagen 48 se puede ver el centro CM del sistema Zn-MIC1 con algunas moléculas de solvatación. En todos los sistemas (Cu, Ni y Zn) se puede ver que no hay coordinación con las aguas ya que las distancias son muy grandes. Las moléculas de agua que atrae el centro CM en todos los sistemas son de solvatación.

**Imagen 48. Aguas de solvatación del centro CM del sistema Zn-MIC1.**

6.3. Puentes de hidrogeno

Se cogieron los puentes de hidrogeno que hay entre los dos dímeros paralelos (donde se ubica la interfase C2) para ver cómo influyen las mutaciones de la Tirosina (TYR) y Asparagina (ASN) en la estabilidad de los sistemas 4His- ΔC^* y MIC1.

Cada monómero de los sistemas 4His- ΔC^* y MIC1 tiene un total de 172 residuos. Dos monómeros están colocados de una posición invertida paralelamente, la unión de estos monómeros es el dímero a analizar. Los puentes de hidrogeno se ubican en tres regiones, como se puede ver en Imagen 49, en la parte superior, inferior y centro. En la zona del centro, la mayoría de los aminoácidos que hacen puentes de hidrogeno se encuentran en la cadena exterior de la ferritina.

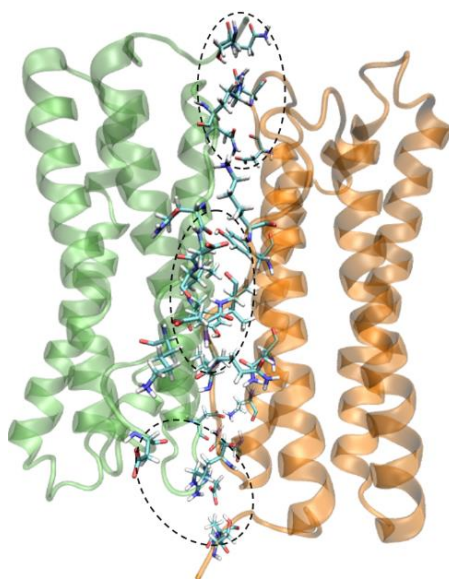


Imagen 49. Aminoácidos que hacen puente de hidrogeno en el dímero del sistema CU-4His- ΔC^* .

Para cada sistema se ha analizado los puentes de hidrogeno del mismo dímero de cada sistema (4His- ΔC^* y MIC1) con una ocurrencia hasta el 10%.

6.3.1. Sistema 4His- ΔC^*

Se puede ver en la Tabla 38 que un dímero del sistema Cu-4His- ΔC^* puede formar hasta 30 puentes de hidrogeno (con una ocurrencia superior al 10% de toda la trayectoria MD), el sistema Ni-4His- ΔC^* (Tabla 39) tiene 23 y el Zn-4His- ΔC^* tiene 29.

En los sistemas Cu-4His- ΔC^* y Zn-4His- ΔC^* los aminoácidos TYR y ASN (color rojo), los cuales son los implicados en la mutación que diferencian el sistema 4His- ΔC^* con el MIC1, hacen el mayor número de puentes de hidrogeno, seis y siete respectivamente. Por otro lado, en el sistema Ni-4His- ΔC^* los aminoácidos TRY y ASN hacen un total de dos puentes de hidrogeno. Estos resultados concuerdan en principio con lo observado experimentalmente, en donde las mutaciones inducen a una pérdida de

estabilidad de la nanoestructura de jaula en el sistema Ni-MIC1 y una drástica reducción de estabilidad en el sistema Zn-MIC1.

6.3.2. Sistema MIC1

El sistema que tiene más puentes de hidrogeno es el Ni-MIC1 (Tabla 41), tiene un total de 45 puentes de hidrogeno. Por otro lado, los sistemas Cu-MIC1 y Zn-MIC1 tienen un total de 29 y 30 puentes de hidrogeno respectivamente.

En el sistema Cu-MIC1 los aminoácidos TRY y ASN tienen una actividad menor (tres puentes de hidrogeno en total) en comparación con el sistema Cu-4His- ΔC^* . Se observa que apenas se redujo el número total de puentes de hidrogeno (30 para el Cu-4His- ΔC^* y 29 para el Cu-MIC1).

De la misma manera, en el sistema Zn-MIC1 también se ha reducido el número de puentes de hidrogeno que hacen los aminoácidos TRY y ASN (dos puentes de hidrogeno) respecto al sistema Zn-4His- ΔC^* . En este sistema Zn-MIC1 solo hace puente de hidrogeno el aminoácido TYR. Se aprecia que el total de puentes de hidrogeno apenas ha variado entre los dos sistemas (29 para el Zn-4His- ΔC^* y 30 para Zn-MIC1).

Por otro lado, el sistema Ni-MIC1 es el único que ha aumentado notablemente el número de puentes de hidrogeno, hasta un total de 45, respecto al sistema Ni-4His- ΔC^* , que tiene 23. En este sistema solo el aminoácido TYR hace puente de hidrogeno.

En general los aminoácidos TRY y ASN de los sistemas MIC1 forman menos puentes de hidrogeno, de ellos el TYR es el que más puentes de hidrogeno forma con una frecuencia de más del 90%. Por otro lado el ASN solo se forma en el sistema Cu-MIC1 con una frecuencia del 17%.

Los resultados observados apuntan hacia una mayor estabilidad del Ni-MIC1 que no acaso los sistemas Cu-MIC1 y Zn-MIC1. Esto va en contra de los resultados experimentales [30]. Dicha divergencia se atribuye a la aproximación introducida en esta simulación al utilizar DM clásica para describir las esferas de coordinación de los metales, forzando así una estabilidad artificial que no se daría si se utilizara métodos mucho más avanzados computacionales como puede ser los híbridos QM/MM-MD, fuera del alcance de este trabajo, aunque fuente de una posible continuación del mismo.

Tabla 38. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero de los sistemas Cu-4His- ΔC^* y Ni-4His- ΔC^* . Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por ciento, d_{OH} es la distancia (Å) y α es el ángulo (en grados).

Dímero CU-4His- ΔC^*						Dímero NI-4His- ΔC^*					
Acceptor	DonorH	Donor	Frac	d_{OH}	α	Acceptor	DonorH	Donor	Frac	d_{OH}	α
ASP_40'@OD2	SER_2@HG	SER_2@OG	98	2,64	163	AP1_80'@OD2	LYS_83@H	LYS_83@N	78	2,85	163
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	94	2,77	153	ASP_40'@OD2	SER_2@HG	SER_2@OG	76	2,66	165
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH22	ARG_75@NH2	77	2,79	150	ASP_40@OD1	SER_2'@HG	SER_2'@OG	67	2,67	166
ILE_81'@O	ILE_81@H	ILE_81@N	64	2,87	158	ASP_40@OD2	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	66	2,76	154
GLN_79'@O	TYR_28@HH	TYR_28@OH	61	2,70	161	ASP_40@OD2	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	50	2,81	149
ASP_40@OD2	SER_2'@HG	SER_2'@OG	60	2,65	162	ASP_88'@OD2	ARG_75@HH11	ARG_75@NH1	42	2,79	158
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	59	2,77	153	GLN_79@O	TYR_28'@HH	TYR_28'@OH	42	2,72	160
GLN_79@O	TYR_28'@HH	TYR_28'@OH	57	2,74	160	ILE_81@O	ILE_81'@H	ILE_81'@N	41	2,89	160
AP1_80@OD2	LYS_83'@H	LYS_83'@N	56	2,86	156	ILE_81'@O	ILE_81@H	ILE_81@N	40	2,89	158
AP1_80'@OD2	LYS_83@H	LYS_83@N	56	2,84	154	ASP_88'@OD1	ARG_75@HH11	ARG_75@NH1	37	2,79	156
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	49	2,80	150	AP1_80@OD2	LYS_83'@H	LYS_83'@N	34	2,89	154
ILE_81@O	ILE_81'@H	ILE_81'@N	48	2,88	157	ASP_40@OD2	SER_2'@HG	SER_2'@OG	31	2,63	159
ASP_40'@OD2	GLN_3@H	GLN_3@N	42	2,82	155	ASP_40@OD1	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	29	2,79	151
ASP_40@OD1	SER_2'@HG	SER_2'@OG	38	2,66	164	ASP_40@OD1	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	27	2,80	151
ASP_40@OD2	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	36	2,81	152	ASP_40@OD2	GLN_3'@H	GLN_3'@N	24	2,79	153
ASP_40@OD2	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	34	2,77	153	ASP_87'@O	LEU_78@H	LEU_78@N	23	2,88	163
ASN_21'@OD1	TYR_28@HH	TYR_28@OH	34	2,69	161	ASP_40'@OD1	SER_2@HG	SER_2@OG	22	2,67	164
ASP_38'@OD1	ASN_70@HD22	ASN_70@ND2	34	2,84	159						
TYR_28@OH	GLN_79'@H	GLN_79'@N	22	2,89	162						
ASP_40@OD2	GLN_3'@H	GLN_3'@N	21	2,81	154						

ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ2	LYS_67'@NZ	20	2,79	158	GLU_90'@OE1	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	15	2,80	156
ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ1	LYS_67'@NZ	19	2,79	159	ASP_38@OD2	ASN_70'@HD22	ASN_70'@ND2	15	2,86	161
ASP_87@OD2	LEU_78'@H	LEU_78'@N	19	2,85	163	ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ2	LYS_67'@NZ	12	2,78	159
ASP_38'@OD2	ASN_70'@HD22	ASN_70'@ND2	18	2,84	161	ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ1	LYS_67'@NZ	12	2,77	158
ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ3	LYS_67'@NZ	18	2,79	157	GLU_90'@OE2	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	12	2,80	155
ASP_87@OD1	LEU_78'@H	LEU_78'@N	17	2,84	163	ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ3	LYS_67'@NZ	11	2,78	158
ASP_38@OD2	ASN_70'@HD22	ASN_70'@ND2	15	2,86	162						
LEU_78'@O	LYS_83@HZ2	LYS_83@NZ	14	2,79	151						
LEU_78'@O	LYS_83@HZ3	LYS_83@NZ	12	2,79	152						
LEU_78'@O	LYS_83@HZ1	LYS_83@NZ	11	2,78	152						

Tabla 39. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero del sistema Zn-4His-ΔC*. Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por cierto, d_{OH} es la distancia (Å) y α es el ángulo (en grados).

Dímero Zn- 4His-ΔC*					
Acceptor	DonorH	Donor	Frac	d_{OH}	α
GLN_79'@O	TYR_28@HH	TYR_28@OH	98	2,67	164
ASP_40'@OD2	SER_2@HG	SER_2@OG	95	2,64	160
GLN_79@O	TYR_28'@HH	TYR_28'@OH	95	2,71	160
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	92	2,79	152
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	90	2,75	157
ASP_40@OD2	SER_2'@HG	SER_2'@OG	89	2,66	164
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH22	ARG_75@NH2	80	2,80	151
ASP_40'@OD2	GLN_3@H	GLN_3@N	61	2,82	155
AP1_80@OD2	LYS_83'@H	LYS_83'@N	59	2,84	155
ILE_81'@O	ILE_81@H	ILE_81@N	59	2,87	156
ILE_81@O	ILE_81'@H	ILE_81'@N	58	2,89	158
TYR_35'@O	ASN_70@HD21	ASN_70@ND2	54	2,86	157
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	50	2,82	149
ASP_40@OD2	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	36	2,85	159
ASP_41'@OD2	ARG_75@HH21	ARG_75@NH2	31	2,83	154
ASP_38'@OD1	ASN_70@HD22	ASN_70@ND2	27	2,87	163
AP1_80'@OD2	LYS_83@H	LYS_83@N	22	2,90	151
ASP_41@OD2	ARG_75'@HH21	ARG_75'@NH2	21	2,84	152
ASP_38'@OD2	ASN_70@HD22	ASN_70@ND2	19	2,86	163
ASP_40@OD2	GLN_3'@H	GLN_3'@N	18	2,83	155
ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ1	LYS_67'@NZ	15	2,80	157

ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ2	LYS_67'@NZ	15	2,80	157
ASP_38@OD1	LYS_67'@HZ3	LYS_67'@NZ	13	2,81	157
ASP_40'@OD2	ARG_75@HH22	ARG_75@NH2	12	2,88	156
ASP_38@OD2	LYS_67'@HZ1	LYS_67'@NZ	12	2,82	154
ASP_38@OD2	LYS_67'@HZ2	LYS_67'@NZ	12	2,81	156
ASP_38@OD2	ASN_70'@HD22	ASN_70'@ND2	11	2,86	164
ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ1	LYS_67@NZ	11	2,78	159
ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ3	LYS_67@NZ	10	2,78	159

Tabla 40. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero de los sistemas Cu-MIC1 y Ni-MIC1. Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por ciento, d_{OH} es la distancia (Å) y α es el ángulo (en grados).

Dímero CU-MIC1						Dímero NI-MIC1					
Acceptor	DonorH	Donor	Frac	d_{OH}	α	Acceptor	DonorH	Donor	Frac	d_{OH}	α
GLN_79@O	TYR_28'@HH	TYR_28'@OH	98	2,67	164	GLN_79@O	TYR_28'@HH	TYR_28'@OH	99	2,66	161
GLN_79'@O	TYR_28@HH	TYR_28@OH	97	2,70	162	ASP_40'@OD1	ARG_75@HH22	ARG_75@NH2	94	2,77	153
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH22	ARG_75@NH2	94	2,74	155	GLN_79'@O	TYR_28@HH	TYR_28@OH	94	2,70	164
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	76	2,81	148	ASP_40'@OD1	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	89	2,79	150
ASP_40'@OD1	SER_2@HG	SER_2@OG	68	2,76	161	ASP_40'@OD2	SER_2@HG	SER_2@OG	85	2,67	157
ASP_40'@OD2	GLN_3@H	GLN_3@N	67	2,83	157	ASP_40'@OD2	GLN_3@H	GLN_3@N	72	2,82	158
GLU_70@OE1	ASP_40'@H	ASP_40'@N	62	2,84	150	ASP_40@OD2	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	66	2,78	154
ILE_81@O	ILE_81'@H	ILE_81'@N	60	2,89	157	ASP_40@OD2	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	58	2,80	151
ASP_40@OD2	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	58	2,77	156	AP1_80'@OD2	LYS_83@H	LYS_83@N	55	2,86	161
ASP_40@OD2	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	54	2,79	154	ASP_40@OD1	SER_2'@HG	SER_2'@OG	51	2,68	159
ILE_81'@O	ILE_81@H	ILE_81@N	50	2,90	158	ILE_81'@O	ILE_81@H	ILE_81@N	51	2,90	156
GLU_60@OE2	HD4_56'@HD1	HD4_56'@ND1	46	2,81	150	ASP_41'@OD2	ARG_75@HH21	ARG_75@NH2	47	2,82	155
ASP_40'@OD2	VAL_4@H	VAL_4@N	45	2,88	162	GLU_60@OE1	HD4_56'@HD1	HD4_56'@ND1	46	2,80	154
AP1_80'@OD2	LYS_83@H	LYS_83@N	36	2,87	152	ASP_40@OD2	SER_2'@HG	SER_2'@OG	45	2,72	163
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	34	2,76	159	ASP_40@OD1	GLN_3'@H	GLN_3'@N	39	2,82	158
ASP_40'@OD2	SER_2@HG	SER_2@OG	33	2,73	152	GLU_60@OE2	HD4_56'@HD1	HD4_56'@ND1	36	2,80	152
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	32	2,81	156	ILE_81@O	ILE_81'@H	ILE_81'@N	26	2,89	150
ASP_41'@OD2	ARG_75@HH21	ARG_75@NH2	31	2,81	155	ASP_40'@O	GLN_3@HE22	GLN_3@NE2	23	2,86	155
ASP_40@OD1	SER_2'@HG	SER_2'@OG	28	2,69	161	ASP_87'@OD2	LEU_78@H	LEU_78@N	21	2,88	164
ASP_40'@OD2	GLN_3@HE22	GLN_3@NE2	27	2,78	158	ASP_40@OD1	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	21	2,78	156
ASP_40@OD2	SER_2'@HG	SER_2'@OG	25	2,71	164	ASP_40'@OD2	VAL_4@H	VAL_4@N	17	2,91	166

ASP_41'@OD1	ARG_75@HH21	ARG_75@NH2	23	2,81	153	ASP_41'@OD2	THR_1@H2	THR_1@N	16	2,80	152
GLU_60@OE1	HD4_56'@HD1	HD4_56'@ND1	21	2,81	151	ASP_41'@OD2	THR_1@H1	THR_1@N	16	2,80	152
AP1_80@OD2	LYS_83'@H	LYS_83'@N	20	2,90	150	GLU_35'@OE1	LYS_67@HZ3	LYS_67@NZ	16	2,80	156
TYR_28@OH	ASN_21'@HD22	ASN_21'@ND2	17	2,91	152	GLU_35'@OE1	LYS_67@HZ2	LYS_67@NZ	15	2,80	157
ASP_40@OD1	GLN_3'@H	GLN_3'@N	16	2,82	160	ASP_41'@OD2	THR_1@H3	THR_1@N	15	2,79	153
ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ2	LYS_67@NZ	10	2,79	158	ASP_41'@OD1	ARG_75@HH21	ARG_75@NH2	15	2,78	153
ASP_40'@O	GLN_3@HE21	GLN_3@NE2	10	2,84	148	ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ2	LYS_67@NZ	14	2,77	159
						GLU_35'@OE1	LYS_67@HZ1	LYS_67@NZ	14	2,80	157
						ASP_38'@OD1	LYS_67@HZ1	LYS_67@NZ	14	2,77	158
						LEU_78@O	LYS_83'@HZ3	LYS_83'@NZ	14	2,83	150
						GLU_35'@OE2	LYS_67@HZ3	LYS_67@NZ	14	2,80	156
						GLU_35'@OE2	LYS_67@HZ1	LYS_67@NZ	13	2,79	156
						ASP_38'@OD1	LYS_67@HZ2	LYS_67@NZ	13	2,78	158
						ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ3	LYS_67@NZ	13	2,78	158
						ASP_40'@OD1	SER_2@HG	SER_2@OG	13	2,83	158
						ASP_41@OD2	ARG_75'@HH21	ARG_75'@NH2	12	2,83	150
						ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ1	LYS_67@NZ	12	2,78	158
						LEU_78@O	LYS_83'@HZ1	LYS_83'@NZ	12	2,83	150
						ASP_40@OD1	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	12	2,80	152
						ASP_38'@OD1	LYS_67@HZ3	LYS_67@NZ	12	2,78	158
						GLU_35'@OE2	LYS_67@HZ2	LYS_67@NZ	12	2,78	157
						LEU_78'@O	LYS_83@HZ1	LYS_83@NZ	11	2,82	150
						LEU_78'@O	LYS_83@HZ2	LYS_83@NZ	10	2,81	150
						LEU_78@O	LYS_83'@HZ2	LYS_83'@NZ	10	2,83	150

Tabla 41. Puentes de hidrogeno que hay en el dímero del sistema Zn-MIC1. Frac es la ocurrencia que tiene cada puente de hidrogeno en tanto por ciento, d_{OH} es la distancia (Å) y α es el ángulo (en grados).

Dímero ZN-MIC1					
Acceptor	DonorH	Donor	Frac	d_{OH}	α
GLN_79'@O	TYR_28@HH	TYR_28@OH	99	2,68	164
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH22	ARG_75'@NH2	98	2,75	159
GLN_79@O	TYR_28'@HH	TYR_28'@OH	98	2,67	164
ASP_40@OD2	GLN_3'@H	GLN_3'@N	81	2,80	158
ASP_40@OD2	SER_2'@HG	SER_2'@OG	62	2,69	155
ASP_40'@OD1	SER_2@HG	SER_2@OG	56	2,68	164
ASP_40@OD1	ARG_75'@HH12	ARG_75'@NH1	55	2,84	147
ILE_81'@O	ILE_81@H	ILE_81@N	55	2,89	156
ASP_40'@OD2	ARG_75@HH22	ARG_75@NH2	54	2,76	156
ILE_81@O	ILE_81'@H	ILE_81'@N	45	2,90	157
AP1_80@OD2	LYS_83'@H	LYS_83'@N	44	2,85	159
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH22	ARG_75@NH2	41	2,76	156
ASP_40'@OD2	SER_2@HG	SER_2@OG	41	2,68	164
ASP_40'@OD2	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	40	2,83	148
ASP_40@OD2	VAL_4'@H	VAL_4'@N	37	2,89	165
ASP_40@OD1	SER_2'@HG	SER_2'@OG	32	2,78	162
ASP_40'@OD1	ARG_75@HH12	ARG_75@NH1	27	2,84	147
ASP_41@OD1	ARG_75'@HH21	ARG_75'@NH2	23	2,82	152
ASP_41@OD2	ARG_75'@HH21	ARG_75'@NH2	23	2,81	152

AP1_80'@OD2	LYS_83@H	LYS_83@N	16	2,88	156
ASP_38'@OD1	LYS_67@HZ2	LYS_67@NZ	15	2,81	157
LEU_78@O	LYS_83'@HZ1	LYS_83'@NZ	14	2,80	152
LEU_78@O	LYS_83'@HZ2	LYS_83'@NZ	13	2,80	152
ASP_38'@OD1	LYS_67@HZ1	LYS_67@NZ	13	2,80	158
LEU_78@O	LYS_83'@HZ3	LYS_83'@NZ	13	2,81	153
ASP_38'@OD1	LYS_67@HZ3	LYS_67@NZ	13	2,80	156
ASP_41'@OD2	ARG_75@HH21	ARG_75@NH2	13	2,82	150
ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ2	LYS_67@NZ	11	2,82	157
ASP_40@O	GLN_3'@HE22	GLN_3'@NE2	11	2,87	152
ASP_38'@OD2	LYS_67@HZ3	LYS_67@NZ	11	2,82	158

5. Análisis del impacto ambiental

Al ser un trabajo teórico sobre una nanopartícula solo se puede hablar de sus efectos que pueden inducir potencialmente toxicidad, debido principalmente al aumento de superficie, de reactividad, al incremento de movilidad y a su paso por las barreras celulares. Conocer su toxicidad intrínseca y la toxicidad debido a la exposición de estos materiales. Otro factor importante es la mal aplicación de las nanopartículas, una estructura inestable inducida en el cuerpo puede provocar graves problemas en el cuerpo del ser humano.

6. Conclusiones

Al analizar la geometría de los centros metálicos se ha podido observar que éstos presentan unas distancias, ángulos y diedros bastante estables, con una desviación típica bastante baja. Los únicos centros donde aumenta un poco la desviación típica (sobre todo en ángulos y diedros) son el C3 y CM del sistema 4His- ΔC^* ya que tienen una mayor complejidad debido a que ambos sistemas están formados por dos iones metálicos por lo que es más difícil mantener una estructura más rígida a lo largo de toda la simulación, por ejemplo los mismos centros (C3 y CM) del sistema MIC1 tienen una desviación típica más baja en su geometría que la del sistema 4His- ΔC^* debido a que están formados solo por un ion metálico. Por último el centro C2-B (Ca) también tiene una desviación típica alta en sus diedros debido a que la glutamina enlazada muestra un movimiento bastante alto en toda la simulación debido a que este centro está en una posición externa de la ferritina, donde está más en contacto con el medio solvente. Aparte de comprobar la estabilidad geométrica de los centros metálicos se observó la estructura que presentan los diferentes metales divalentes en los centros metálicos. Se observó que el cobre tiene una estructura tetraédrica, el níquel por su parte tiene una estructura plana y el zinc un tetraedro distorsionado (forma de balancín), estas estructuras están definidas por el agua de coordinación que presenta cada metal. Por ejemplo, el cobre tiene la estructura tetraédrica por que no se coordinaba perfectamente con la molécula de agua, en cambio el níquel y zinc se coordinan con una molécula de agua. El zinc es el que atrae más fuerte a la molécula (menor distancia) es por esto que la estructura de los centros con níquel y zinc varían. Por último cabe mencionar el intento de coordinación de algunos centros metálicos con las moléculas de agua hace que aumente la desviación estándar en su geometría.

La estructura que tiene cada tipo de centro metálico y su estabilidad depende de la coordinación con el medio solvente, como se ha podido observar en la función de distribución radial, porque un ion metálico será más estable al estar coordinado con más moléculas de agua. Otro factor que influye en la coordinación es el acceso del medio solvente al centro metálico, un centro metálico que está más expuesto al solvente tiene más probabilidad de coordinarse con más moléculas de agua. Y por último, otro factor que influye en la coordinación es el número de enlaces que tenga el ion metálico.

La coordinación con el agua solo se puede establecer hasta una distancia de 3Å como máximo, por lo que una distancia más grande ya no se puede considerar aguas de coordinación sino aguas de solvatación. En algunos casos los centros con níquel y zinc, tanto de los sistemas 4His- ΔC^* y MIC1, mostraron más coordinación con el agua que los centros con cobre, en otros casos los centros con los tres metales divalentes mostraron solo aguas de solvatación debido a los factores antes mencionados. En el caso de los centros con iones de calcio los únicos que se coordinaron con el agua son los centros C2-B (Ca).

Por último, se ha observado que las mutaciones de tirosina (TYR) y Asparagina (ASN) hacen menos puentes de hidrogeno en el sistema MIC1 que en el 4His- ΔC^* pero a cambio aparecen otros puentes de hidrogeno sin comprometer la estructura de la ferritina. En los sistemas con cobre y zinc el número total de puentes de hidrogeno apenas varía en los sistemas de 4His- ΔC^* y MIC1.

El único caso que llama la atención son los sistemas con níquel que pasa de 23 puentes de hidrogeno (Ni-4His- ΔC^*) a 45 puentes de hidrogeno (Ni-MIC1), por lo que se podría deducirse que la mutación refuerza la estabilidad del sistema Ni-MIC1 en comparación con el Ni-4His- ΔC^* , lo cual va en contra de lo observado experimentalmente. Esto podría ser debido a un artefacto de la simulación con dinámica molecular clásica, en donde la simplificación utilizada fuerza a mantener la coordinación del Ni a unos ciertos valores predeterminados, mediante el campo de fuerza utilizado, dando lugar a una mayor sobre-estabilidad de la que se hubiera obtenido utilizando métodos más caros computacionalmente como pueden ser los de dinámica molecular cuántica. Un estudio más exhaustivo utilizando metodología híbrida QM/MM-MD se hace necesaria para estudiar la diferencia de estabilidad de dicha interface. Para ello, se hace necesario el modelado clásico de dichos sistemas, tal y como se ha procedido en este trabajo, como paso necesario para poder aplicar simulaciones más avanzadas en un futuro próximo.

7. Análisis Económico

En este trabajo, al ser uno teórico, se ha considerado las horas empleadas en la simulación, extracción de datos y memoria. El tiempo de simulación es el tiempo que ha tardado un nodo del *cluster* en realizar el equilibrado y la producción de todos los sistemas (seis sistemas a estudiar hasta 90ns), es el tiempo que más se necesita para realizar este trabajo. Para la extracción de datos se ha considerado el tiempo empleado en extraer las distancias, ángulos, ángulos diedros, función de distribución radial (RDF) y puentes de hidrogeno. Para los datos geométricos (distancias, ángulos y ángulos diedros) se ha hecho el promedio de cada centro, siendo un total de 86 centros metálicos. La RDF se ha hecho para cada tipo de centro metálico y los puentes de hidrogeno que se han extraído son de los 12 dímeros que forman cada sistema. Todos los resultados se han analizado con ayuda del programa VMD, se ha visualizado cada centro metálico y su comportamiento. Por último, el tiempo necesario en hacer la memoria, en este apartado se incluye la parte de documentación, redacción y el “renderizado” de las imágenes en VMD.

El aprendizaje en este trabajo ha sido continuo por la cantidad de programas que se han utilizado para analizar los sistemas estudiados. Primero, en comprender el funcionamiento, de una forma muy básica, el programa AMBER y el Cpptraj (el tiempo empleado en leer el manual del programa). Segundo, en estudiar los comandos del sistema operativo Linux, aparte de usarlo para acceder al nodo del “cluster”, necesarios para tratar los datos extraídos. Y por último en aprender a usar el VMD, para visualizar y renderizar las imágenes.

El precio energético es de 0,13 €/kWh, la potencia del nodo de trabajo que se ha empleado es de 1400W, la potencia de la estación de trabajo es de 200W y el precio de la persona es de 8€/h (becario). Por último se ha añadido el precio de la amortización que ha durado la simulación, cada nodo tiene un valor de 8000€ y el tiempo de amortización del hardware informático es de 5 años. A continuación se presenta un desglose de las horas empleadas y el precio de cada apartado.

Tabla 42. Coste de trabajo.

HORAS DE TRABAJO			
UNIDAD	h	€/h	Costo(€)
MEMORIA	480	8	3840
EXTRACCION DATOS	320	8	2560
CONSUMO ENERGETICO			
UNIDAD	h	€/kWh	Costo(€)
NODO DE TRABAJO	2237	0,13	407,134
ESTACION DE TRABAJO	1280	0,13	33,28
AMORTIZACION NODO			400
TOTAL			7.240,41 €

8. Bibliografia

- [1] D. A. Case *et al.*, "The Amber biomolecular simulation programs," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1668–1688, Dec. 2005.
- [2] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: Visual molecular dynamics," *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, Feb. 1996.
- [3] J.-F. Briat *et al.*, "New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants," *Ann. Bot.*, vol. 105, no. 5, pp. 811–822, May 2010.
- [4] G. C. Ford *et al.*, "Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 304, no. 1121, pp. 551–65, Feb. 1984.
- [5] M. C. Linder, H. R. Kakavandi, P. Miller, P. L. Wirth, and G. M. Nagel, "Dissociation of ferritins," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 269, no. 2, pp. 485–496, Mar. 1989.
- [6] Y. Zhang and B. P. Orner, "Self-Assembly in the Ferritin Nano-Cage Protein Superfamily," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 8, pp. 5406–5421, Aug. 2011.
- [7] P. M. Proulx-Curry and N. D. Chasteen, "Molecular aspects of iron uptake and storage in ferritin," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 144, pp. 347–368, Oct. 1995.
- [8] J. G. Wardeska, B. Viglione, and D. Chasteen, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 1986.
- [9] G. Jutz, P. van Rijn, B. Santos Miranda, and A. Böker, "Ferritin: A Versatile Building Block for Bionanotechnology," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 4, pp. 1653–1701, Feb. 2015.
- [10] J. D. Klemm, S. L. Schreiber, and G. R. Crabtree, "DIMERIZATION AS A REGULATORY MECHANISM IN SIGNAL TRANSDUCTION," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 569–592, Apr. 1998.
- [11] S. Jones and J. M. Thornton, "Principles of protein-protein interactions.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 1, pp. 13–20, Jan. 1996.
- [12] Z. Guo, D. Zhou, and P. G. Schultz, "Designing small-molecule switches for protein-protein interactions.," *Science*, vol. 288, no. 5473, pp. 2042–5, Jun. 2000.
- [13] E. N. Salgado, R. A. Lewis, J. Faraone-Mennella, and F. A. Tezcan, "Metal-Mediated Self-Assembly of Protein Superstructures: Influence of Secondary Interactions on Protein Oligomerization and Aggregation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 19, pp. 6082–6084, May 2008.
- [14] I. Yamashita, K. Iwahori, and S. Kumagai, "Ferritin in the field of nanodevices," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1800, no. 8, pp. 846–857, Aug. 2010.
- [15] † Ryan M. Kramer, ‡ Chester Li, ‡ Daniel C. Carter, † and Morley O. Stone, and † Rajesh R. Naik*, "Engineered Protein Cages for Nanomaterial Synthesis," 2004.
- [16] E. N. Salgado, X. I. Ambroggio, J. D. Brodin, R. A. Lewis, B. Kuhlman, and F. A. Tezcan, "Metal

- templated design of protein interfaces,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 5, pp. 1827–32, Feb. 2010.
- [17] D. J. E. Huard, K. M. Kane, and F. A. Tezcan, “Re-engineering protein interfaces yields copper-inducible ferritin cage assembly,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 3, pp. 169–176, Mar. 2013.
- [18] C. Hershko, A. M. Konijn, and P. Aisen, *Progress in Iron Research*. Springer US, 1994.
- [19] R. Notman and J. Anwar, “Breaching the skin barrier — Insights from molecular simulation of model membranes,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 2, pp. 237–250, Feb. 2013.
- [20] M. Hernández-Rodríguez, M. C. Rosales-Hernández, J. E. Mendieta-Wejebe, M. Martínez-Archundia, and J. Correa Basurto, “Current Tools and Methods in Molecular Dynamics (MD) Simulations for Drug Design,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 23, no. 34, pp. 3909–3924, Nov. 2016.
- [21] F. C. Bernstein *et al.*, “The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures,” *J. Mol. Biol.*, vol. 112, no. 3, pp. 535–542, May 1977.
- [22] D. A. Case Ross C Walker SDSC and U. E. Thomas Cheatham III Carlos Simmerling Adrian Roitberg Kenneth M Merz Ray Luo Tom Darden Junmei Wang, “Amber 2016 Reference Manual.”
- [23] M. C. Lee and Y. Duan, “Distinguish protein decoys by Using a scoring function based on a new AMBER force field, short molecular dynamics simulations, and the generalized born solvent model,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 55, no. 3, pp. 620–634, Apr. 2004.
- [24] Y. Duan *et al.*, “A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations,” *J. Comput. Chem.*, vol. 24, no. 16, pp. 1999–2012, Dec. 2003.
- [25] D. R. Roe and T. E. Cheatham, “PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 9, no. 7, pp. 3084–3095, Jul. 2013.
- [26] I. Kufareva and R. Abagyan, “Methods of protein structure comparison,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 857, pp. 231–57, 2012.
- [27] A. Marjolin *et al.*, “Toward accurate solvation dynamics of lanthanides and actinides in water using polarizable force fields: from gas-phase energetics to hydration free energies,” *Theor. Chem. Acc.*, vol. 131, no. 4, p. 1198, Apr. 2012.
- [28] J. F. and and † P. M. Rodger*, “Solvation Structure around Aqueous Alcohols,” 1999.
- [29] A. E. Hamburger, A. P. West, Z. A. Hamburger, P. Hamburger, and P. J. Bjorkman, “Crystal Structure of a Secreted Insect Ferritin Reveals a Symmetrical Arrangement of Heavy and Light Chains,” *J. Mol. Biol.*, vol. 349, no. 3, pp. 558–569, Jun. 2005.
- [30] J. Torras and C. Alemán, “Massive quantum regions for simulations on bio-nanomaterials: synthetic ferritin nanocages,” *Chem. Commun.*, vol. 54, no. 17, pp. 2118–2121, Feb. 2018.

9. Anexo A

Información de todos los centros metálicos y de los comandos empleados para la extracción de datos.

A1. Centros Metálicos

Sistema 4His-ΔC*

Centros C4

2:C4	174	CU	169	HID	705	HID	3007	HID	3535	HID
7:C4	353	CU	348	HID	527	HID	3183	HID	3359	HID
20:C4	888	CU	883	HID	1413	HID	2295	HID	2829	HID
24:C4	1065	CU	1060	HID	1237	HID	2473	HID	2651	HID
34:C4	1594	CU	1589	HID	2119	HID	3887	HID	4063	HID
38:C4	1771	CU	1766	HID	1943	HID	3711	HID	4239	HID

Centros C3

5:C3	178	CAD	179	CAD	127	ASP	130	GLU	1195	ASP	1198	GLU	1724	ASP	1727	GLU
10:C3	357	CAD	358	CAD	306	ASP	309	GLU	841	ASP	844	GLU	1901	ASP	1904	GLU
14:C3	535	CAD	536	CAD	485	ASP	488	GLU	1018	ASP	1021	GLU	1547	ASP	1550	GLU
18:C3	713	CAD	714	CAD	663	ASP	666	GLU	1371	ASP	1374	GLU	2077	ASP	2080	GLU
50:C3	2303	CAD	2304	CAD	2253	ASP	2256	GLU	3317	ASP	3320	GLU	3845	ASP	3848	GLU
54:C3	2481	CAD	2482	CAD	2431	ASP	2434	GLU	2965	ASP	2968	GLU	4021	ASP	4024	GLU
58:C3	2659	CAD	2660	CAD	2609	ASP	2612	GLU	3141	ASP	3144	GLU	3669	ASP	3672	GLU
62:C3	2837	CAD	2838	CAD	2787	ASP	2790	GLU	3493	ASP	3496	GLU	4197	ASP	4200	GLU

Centros C2-A

1:C2	173	CU	59	HID	63	HID	4122	HID	4126	HID
6:C2	352	CU	238	HID	242	HID	3594	HID	3598	HID
11:C2	531	CU	417	HID	421	HID	3770	HID	3774	HID
15:C2	709	CU	595	HID	599	HID	3946	HID	3950	HID
19:C2	887	CU	773	HID	777	HID	3242	HID	3246	HID
23:C2	1064	CU	950	HID	954	HID	3066	HID	3070	HID
27:C2	1241	CU	1127	HID	1131	HID	2890	HID	2894	HID
30:C2	1417	CU	1303	HID	1307	HID	3418	HID	3422	HID
33:C2	1593	CU	1479	HID	1483	HID	2356	HID	2360	HID
37:C2	1770	CU	1656	HID	1660	HID	2534	HID	2538	HID
41:C2	1947	CU	1833	HID	1837	HID	2712	HID	2716	HID
44:C2	2123	CU	2009	HID	2013	HID	2178	HID	2182	HID
47:C2	2299	CU	2002	HID	2006	HID	2185	HID	2189	HID
51:C2	2477	CU	1472	HID	1476	HID	2363	HID	2367	HID
55:C2	2655	CU	1649	HID	1653	HID	2541	HID	2545	HID



59:C2	2833	CU	1826	HID	1830	HID	2719	HID	2723	HID
63:C2	3011	CU	1120	HID	1124	HID	2897	HID	2901	HID
66:C2	3187	CU	943	HID	947	HID	3073	HID	3077	HID
69:C2	3363	CU	766	HID	770	HID	3249	HID	3253	HID
72:C2	3539	CU	1296	HID	1300	HID	3425	HID	3429	HID
75:C2	3715	CU	231	HID	235	HID	3601	HID	3605	HID
78:C2	3891	CU	410	HID	414	HID	3777	HID	3781	HID
81:C2	4067	CU	588	HID	592	HID	3953	HID	3957	HID
84:C2	4243	CU	52	HID	56	HID	4129	HID	4133	HID

Centros C2-B

4:C2	177	CAD	82	GLN	4150	ASP
9:C2	356	CAD	261	GLN	3622	ASP
13:C2	534	CAD	440	GLN	3798	ASP
17:C2	712	CAD	618	GLN	3974	ASP
22:C2	891	CAD	796	GLN	3270	ASP
26:C2	1068	CAD	973	GLN	3094	ASP
29:C2	1244	CAD	1150	GLN	2918	ASP
32:C2	1420	CAD	1326	GLN	3446	ASP
36:C2	1597	CAD	1502	GLN	2384	ASP
40:C2	1774	CAD	1679	GLN	2562	ASP
43:C2	1950	CAD	1856	GLN	2740	ASP
46:C2	2126	CAD	2032	GLN	2206	ASP
49:C2	2302	CAD	2030	ASP	2208	GLN
53:C2	2480	CAD	1500	ASP	2386	GLN
57:C2	2658	CAD	1677	ASP	2564	GLN
61:C2	2836	CAD	1854	ASP	2742	GLN
65:C2	3014	CAD	1148	ASP	2920	GLN
68:C2	3190	CAD	971	ASP	3096	GLN
71:C2	3366	CAD	794	ASP	3272	GLN
74:C2	3542	CAD	1324	ASP	3448	GLN
77:C2	3718	CAD	259	ASP	3624	GLN
80:C2	3894	CAD	438	ASP	3800	GLN
83:C2	4070	CAD	616	ASP	3976	GLN
86:C2	4246	CAD	80	ASP	4152	GLN

Centros CM

3:CM	175	CU	176	CU	58	GLU	103	GLU	23	GLU	61	HIE
8:CM	354	CU	355	CU	237	GLU	282	GLU	202	GLU	240	HIE
12:CM	532	CU	533	CU	416	GLU	461	GLU	381	GLU	419	HIE
16:CM	710	CU	711	CU	594	GLU	639	GLU	559	GLU	597	HIE
21:CM	889	CU	890	CU	772	GLU	817	GLU	737	GLU	775	HIE
25:CM	1066	CU	1067	CU	949	GLU	994	GLU	914	GLU	952	HIE
28:CM	1242	CU	1243	CU	1126	GLU	1171	GLU	1091	GLU	1129	HIE



31:CM	1418	CU	1419	CU	1302	GLU	1347	GLU	1267	GLU	1305	HIE
35:CM	1595	CU	1596	CU	1478	GLU	1523	GLU	1443	GLU	1481	HIE
39:CM	1772	CU	1773	CU	1655	GLU	1700	GLU	1620	GLU	1658	HIE
42:CM	1948	CU	1949	CU	1832	GLU	1877	GLU	1797	GLU	1835	HIE
45:CM	2124	CU	2125	CU	2008	GLU	2053	GLU	1973	GLU	2011	HIE
48:CM	2300	CU	2301	CU	2184	GLU	2229	GLU	2149	GLU	2187	HIE
52:CM	2478	CU	2479	CU	2362	GLU	2407	GLU	2327	GLU	2365	HIE
56:CM	2656	CU	2657	CU	2540	GLU	2585	GLU	2505	GLU	2543	HIE
60:CM	2834	CU	2835	CU	2718	GLU	2763	GLU	2683	GLU	2721	HIE
64:CM	3012	CU	3013	CU	2896	GLU	2941	GLU	2861	GLU	2899	HIE
67:CM	3188	CU	3189	CU	3072	GLU	3117	GLU	3037	GLU	3075	HIE
70:CM	3364	CU	3365	CU	3248	GLU	3293	GLU	3213	GLU	3251	HIE
73:CM	3540	CU	3541	CU	3424	GLU	3469	GLU	3389	GLU	3427	HIE
76:CM	3716	CU	3717	CU	3600	GLU	3645	GLU	3565	GLU	3603	HIE
79:CM	3892	CU	3893	CU	3776	GLU	3821	GLU	3741	GLU	3779	HIE
82:CM	4068	CU	4069	CU	3952	GLU	3997	GLU	3917	GLU	3955	HIE
85:CM	4244	CU	4245	CU	4128	GLU	4173	GLU	4093	GLU	4131	HIE

Sistema MIC1

Centros C4

3:C4	175	CU	169	HID	527	HID	3723	HID	4077	HID
8:C4	354	CU	348	HID	705	HID	3900	HID	4254	HID
21:C4	889	CU	883	HID	1239	HID	3192	HID	3546	HID
25:C4	1067	CU	1061	HID	1416	HID	3015	HID	3369	HID
35:C4	1599	CU	1593	HID	1949	HID	2303	HID	2659	HID
39:C4	1777	CU	1771	HID	2126	HID	2481	HID	2837	HID

Centros C3

5:C3	177	CAD	127	ASP	130	GLU	841	ASP	844	GLU	1551	ASP	1554	GLU
10:C3	356	CAD	306	ASP	309	GLU	1197	ASP	1200	GLU	2084	ASP	2087	GLU
14:C3	534	CAD	485	ASP	488	GLU	1374	ASP	1377	GLU	1729	ASP	1732	GLU
18:C3	712	CAD	663	ASP	666	GLU	1019	ASP	1022	GLU	1907	ASP	1910	GLU
50:C3	2310	CAD	2261	ASP	2264	GLU	2973	ASP	2976	GLU	3681	ASP	3684	GLU
54:C3	2488	CAD	2439	ASP	2442	GLU	3327	ASP	3330	GLU	4212	ASP	4215	GLU
58:C3	2666	CAD	2617	ASP	2620	GLU	3504	ASP	3507	GLU	3858	ASP	3861	GLU
62:C3	2844	CAD	2795	ASP	2798	GLU	3150	ASP	3153	GLU	4035	ASP	4038	GLU

Centros C2-A

2:C2	174	CU	52	HID	56	HID	3082	HID	3086	HID
7:C2	353	CU	231	HID	235	HID	3436	HID	3440	HID
12:C2	532	CU	410	HID	414	HID	2905	HID	2909	HID
16:C2	710	CU	588	HID	592	HID	3259	HID	3263	HID
20:C2	888	CU	766	HID	770	HID	2549	HID	2553	HID
24:C2	1066	CU	944	HID	948	HID	2193	HID	2197	HID
28:C2	1244	CU	1122	HID	1126	HID	2727	HID	2731	HID
31:C2	1421	CU	1299	HID	1303	HID	2371	HID	2375	HID
34:C2	1598	CU	1476	HID	1480	HID	3613	HID	3617	HID
38:C2	1776	CU	1654	HID	1658	HID	3967	HID	3971	HID
42:C2	1954	CU	1832	HID	1836	HID	3790	HID	3794	HID
45:C2	2131	CU	2009	HID	2013	HID	4144	HID	4148	HID
48:C2	2308	CU	951	HID	955	HID	2186	HID	2190	HID
52:C2	2486	CU	1306	HID	1310	HID	2364	HID	2368	HID
56:C2	2664	CU	773	HID	777	HID	2542	HID	2546	HID
60:C2	2842	CU	1129	HID	1133	HID	2720	HID	2724	HID
64:C2	3020	CU	417	HID	421	HID	2898	HID	2902	HID
67:C2	3197	CU	59	HID	63	HID	3075	HID	3079	HID
70:C2	3374	CU	595	HID	599	HID	3252	HID	3256	HID
73:C2	3551	CU	238	HID	242	HID	3429	HID	3433	HID
76:C2	3728	CU	1483	HID	1487	HID	3606	HID	3610	HID
79:C2	3905	CU	1839	HID	1843	HID	3783	HID	3787	HID
82:C2	4082	CU	1661	HID	1665	HID	3960	HID	3964	HID
85:C2	4259	CU	2016	HID	2020	HID	4137	HID	4141	HID

Centros C2-B

4:C2	176	CAD	82	GLN	3103	ASP
9:C2	355	CAD	261	GLN	3457	ASP
13:C2	533	CAD	440	GLN	2926	ASP
17:C2	711	CAD	618	GLN	3280	ASP
22:C2	890	CAD	796	GLN	2570	ASP
26:C2	1068	CAD	974	GLN	2214	ASP
29:C2	1245	CAD	1152	GLN	2748	ASP
32:C2	1422	CAD	1329	GLN	2392	ASP
36:C2	1600	CAD	1506	GLN	3634	ASP
40:C2	1778	CAD	1684	GLN	3988	ASP
43:C2	1955	CAD	1862	GLN	3811	ASP
46:C2	2132	CAD	2039	GLN	4165	ASP
49:C2	2309	CAD	972	ASP	2216	GLN
53:C2	2487	CAD	1327	ASP	2394	GLN
57:C2	2665	CAD	794	ASP	2572	GLN
61:C2	2843	CAD	1150	ASP	2750	GLN

65:C2	3021	CAD	438	ASP	2928	GLN
68:C2	3198	CAD	80	ASP	3105	GLN
71:C2	3375	CAD	616	ASP	3282	GLN
74:C2	3552	CAD	259	ASP	3459	GLN
77:C2	3729	CAD	1504	ASP	3636	GLN
80:C2	3906	CAD	1860	ASP	3813	GLN
83:C2	4083	CAD	1682	ASP	3990	GLN
86:C2	4260	CAD	2037	ASP	4167	GLN

Centros CM

1:CM	173	CU	23	GLU	58	GLU	61	HIE
6:CM	352	CU	202	GLU	237	GLU	240	HIE
11:CM	531	CU	381	GLU	416	GLU	419	HIE
15:CM	709	CU	559	GLU	594	GLU	597	HIE
19:CM	887	CU	737	GLU	772	GLU	775	HIE
23:CM	1065	CU	915	GLU	950	GLU	953	HIE
27:CM	1243	CU	1093	GLU	1128	GLU	1131	HIE
30:CM	1420	CU	1270	GLU	1305	GLU	1308	HIE
33:CM	1597	CU	1447	GLU	1482	GLU	1485	HIE
37:CM	1775	CU	1625	GLU	1660	GLU	1663	HIE
41:CM	1953	CU	1803	GLU	1838	GLU	1841	HIE
44:CM	2130	CU	1980	GLU	2015	GLU	2018	HIE
47:CM	2307	CU	2157	GLU	2192	GLU	2195	HIE
51:CM	2485	CU	2335	GLU	2370	GLU	2373	HIE
55:CM	2663	CU	2513	GLU	2548	GLU	2551	HIE
59:CM	2841	CU	2691	GLU	2726	GLU	2729	HIE
63:CM	3019	CU	2869	GLU	2904	GLU	2907	HIE
66:CM	3196	CU	3046	GLU	3081	GLU	3084	HIE
69:CM	3373	CU	3223	GLU	3258	GLU	3261	HIE
72:CM	3550	CU	3400	GLU	3435	GLU	3438	HIE
75:CM	3727	CU	3577	GLU	3612	GLU	3615	HIE
78:CM	3904	CU	3754	GLU	3789	GLU	3792	HIE
81:CM	4081	CU	3931	GLU	3966	GLU	3969	HIE
84:CM	4258	CU	4108	GLU	4143	GLU	4146	HIE

A2. Comandos Cpptraj

RMSD

Estructura: “rms [conjunto de datos] <átomos> out [archivo de salida]”

Ejemplo: “rms all @C,O,N,CA out rms_all.dat”

Distancia

Comando: “*distance*” – Calcula la distancia entre dos átomos.

Estructura: “*distance* [conjunto de datos] <átomo 1> <átomo 2> *out* [archivo de salida]”

Ejemplo: “*distance* d1-2 :1 :2 *out* d1-2.dat”

Angulo

Comando: “*angle*” – Calcula el ángulo (en grados) entre tres átomos. El átomo 2 es el central.

Estructura: “*angle* [conjunto de datos] <átomo 1> <átomo 2> <átomo 3> *out* [archivo de salida]”

Ejemplo: “*angle* ang1 :1 :2 :3 *out* ang1.dat”

Diedro

Comando: “*dihedral*” – Calcula el ángulo diedro (en grados) entre los planos formados entre 4 átomos, <átomo 1> <átomo 2> <átomo 3> y <átomo 2> <átomo 3> <átomo 4>.

Estructura: “*dihedral* [conjunto de datos] <átomo 1> <átomo 2> <átomo 3> <átomo 4> *out* [archivo de salida]”

Ejemplo: “*dihedral* dihe1 :1 :2 :3 :4 *out* dihe1.dat”

Radial

Comando: “*radial*”, calcula la función de distribución radial entre los átomos de soluto y solventes hasta un valor R máximo. El RDF se muestra en un histograma donde se indica el número de probabilidad de partículas encontradas en función de la distancia R.

Estructura: “*radial* [archivo de salida] <intervalo> <valor máximo> < átomos solventes> <átomos solutos> *intrdf* [archivo]”

Intrdf es una instrucción que integra la función resultante.

Ejemplo: “*radial* C4 :WAT@O :174,353,888,1065,1594,1771 *intrdf* C4”

Puente de hidrogeno

Comando: “*hbond*”, calcula los puentes de hidrogeno entre un átomo “*acceptor*” y uno donador “*donor*”.

hbond All *out* All.hbvttime.dat solventdonor :WAT solventacceptor :WAT@O avgout All.UU.avg.dat

